

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG ANTIHEPATOTOXISCHER
FLAVONOIDE AUS GARCINIA KOLA NÜSSEN UND UNTERSUCHUNG
IHRES EINFLUSSES AUF DIE PROTEIN- UND NUCLEINSÄURE-
SYNTHESE VON LEBERPARENCHYMZELLEN SOWIE DEREN
MEMBRANPERMEABILITÄT.

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ifeanyi Madubunyi
aus
Nigeria

Dezember 1986

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen
Akademischen Austauschdienstes.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Sonnenbichler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 30 . 1 . 1987

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE -
THEATERTHEATRE UND THEATERTHEATRE

MEINEN ELTERN
IN ERINNERUNG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS	1
I. EINLEITUNG	1
II. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	5
1. Isolierung und Identifizierung der biologisch aktiven Verbindungen aus <i>Garcinia kola</i> Nussen	5
1.1 Auswahl der biologischen Testmethoden	5
1.2 Rohfraktionierung der Inhaltsstoffe aus <i>Garcinia kola</i> Nussen	7
1.3 Beeinflussung der durch CCl_4 verursachten Schlafzeitverlängerung in Ratten durch die Extrakte aus <i>Garcinia kola</i> Nussen	9
1.4 Isolierung der leberaktiven Verbindungen aus <i>G. kola</i> Nussen	11
1.4.1 Chromatographische Analyse	11
1.4.2 Präparative Auftrennung der "aktiven Verbindungen" der EtOAc-Fraktion	13
1.4.3 Reindarstellung der Inhaltsstoffe der EtOAc-Fraktion durch präparative Dunnschichtchromatographie	14
1.5 Einfluß der Rohextrakte und der gereinigten Inhaltsstoffe aus <i>G. kola</i> Nussen auf die durch CCl_4 - oder GalN-bedingte Enzymfreisetzung aus Hepatozyten	15

1.6 Untersuchungen zur chemischen Struktur der biologisch aktiven Inhaltsstoffe aus <i>Garcinia kola</i> Nüssen	18
1.6.1 Identifizierung der Verbindungen EA-2 und EA-3 als Flavanonole durch Farbreaktionen	19
1.6.2 UV-Spektren	19
1.6.3 IR-Spektren	19
1.6.4 Massenspektren	21
1.6.5 NMR-Spektren	23
1.6.6 Die chemische Struktur von EA-3 und EA-2	28
1.6.7 CD-Spektren und absolute Konfiguration von EA-2 und EA-3	31
2. Untersuchungen zum Einfluß der leberaktiven <i>Garcinia</i> -Inhaltsstoffe auf die Protein- und Nucleinsäuresynthese in der Leberzelle	34
2.1 Untersuchungen zur Beeinflussung der Protein-Synthese durch die antihepatotoxischen <i>Garcinia</i> -Flavonoide EA-2 und EA-3	35
2.1.1 Zeitverlauf der Protein-Synthese unter dem Einfluß von EA-2 bzw. EA-3	36
2.1.2 Konzentrationsabhängigkeit der Beeinflussung der Protein-Synthese durch EA-3 bzw. EA-2	37

2.1.3	Zeitverlauf der Protein-Synthese unter dem Einfluß von hohen Konzentrationen EA-2 bzw. EA-3	39
2.1.4	Diskussion der Ergebnisse zur Beeinflussung der Protein-Synthese in vitro durch die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide	42
2.2	Experimente zum Einfluß der antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide auf die RNA-Synthese in isolierten Ratten-Hepatozyten	45
2.2.1	Zeitverlauf der RNA-Synthese unter dem Einfluß von EA-2 bzw. EA-3	46
2.2.2	Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von EA-2 bzw. EA-3 auf die RNA-Synthese	47
2.2.3	Zeitverlauf der RNA-Synthese unter dem Einfluß hoher Konzentrationen EA-2 bzw. EA-3	48
2.3	Untersuchung zur Beeinflussung der RNA-Synthese in isolierten Zellkernen durch die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide	49
2.4	Diskussion zur Beeinflussung der Protein- und RNA-Synthese durch die antihepatotoxischen Garcinia-Biflavonoide EA-3 und EA-2	51
2.5	Untersuchungen zur Bindung von ^3H -Estradiol an den Estradiolrezeptor aus Schweineuterus in Gegenwart von Silibinin und EA-3	54

2.6 Taxifolin, ein Spaltmetabolit von EA-3 in Leberhomogenaten	56
3. Untersuchung zur Beeinflussung der Precursor- Aufnahme in Hepatozyten durch die Garcinia- Biflavonoide	59
3.1 Beeinflussung der Precursoraufnahme in Zellkulturen in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen der Garcinia-Biflavonoide	59
3.1.1 Zeitverlauf der Uridinaufnahme in Hepatozyten unter dem Einfluß von EA-3 und Silibinin	60
3.1.2 Uridinaufnahme in Ratten-Hepatozyten in Gegenwart unterschiedlicher Konzentra- tionen von EA-3 bzw. Silibinin	62
3.1.3 Methioninaufnahme in Ratten-Hepatozyten unter dem Einfluß von EA-3 und Silibinin	63
3.1.4 Methioninaufnahme in Ratten-Hepatozyten unter dem Einfluß unterschiedlicher Mengen EA-3 bzw. Silibinin	65
3.1.5 Beeinflussung der Thymidinaufnahme in Ratten-Hepatozyten durch Silibinin	66
3.2 Diskussion der Versuche zur Hemmung der Precursoraufnahme in Hepatozyten durch höhere Konzentrationen der Garcinia-Fla- vonoide bzw. Silibinin	67

3.2.1 Einfluß von EA-3 und Silibinin auf die D-Galactosaminaufnahme in Hepatozyten	68
3.2.2 Beeinflussung der α -Aminoisobuty- rataufnahme in Ratten-Hepatozyten durch EA-3 und Silibinin	71
3.2.3 Beeinflussung der Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in Ratten-Hepatozyten durch EA-3 und Silibinin	74
3.2.4 Diskussion zur Beeinflussung der Membranpermeabilität durch die anti- hepatotoxischen Garcinia-Flavonoide	76
3.3 Einige Experimente zur Natur der Flavonoid- Membran-Interaktion	77
3.3.1 ^3H -Inulinfreisetzung aus Liposomen durch Behandlung mit Na-Cholat in Gegenwart der Flavonoide	81
3.3.2 Beeinflussung der Membran-ATPase-Akti- vität durch das Garcinia-Flavonoid EA-3 und Silibinin	84
3.3.3 Zusammenfassung der Befunde zur Inter- aktion der Garcinia-Biflavonoide und von Silibinin mit Membrankomponenten	85
3.3.4 Nachweis der Bindung von Silibinin an Leberzellmembranen durch Autoradiographie	87

III. EXPERIMENTELLER TEIL	89
1. Materialien	89
2. Methoden	91
2.1 Chemische Methoden zur Isolierung der Verbindungen aus Garcinia kola Nussen	91
2.1.1 Extraktion der Garcinia kola Nusse	91
2.1.2 Fraktionierung der EtOH-Fraktion	91
2.1.3 Saulenchromatographie der EtOAc-Fraktion	93
2.1.4 Präparative Dunnschichtchromatographie	94
Isolierung von EA-1, EA-2, EA-2a, EA-2b, EA-2c, EA-3, EA-4, EA-5 und EA-6	94
Isolierung von EA-I, EA-II, EA-III, EA-V, EA-IV und EA-V	95
2.2 Physikalische Untersuchungsmethoden	95
2.2.1 Methoden	95
2.2.2 Physikalische Daten von EA-3	96
2.2.3 Physikalische Daten von EA-2	97
2.3 Biologische und biochemische Experimente	97

2.3.1	Schlafzeitbeeinflussung bei den in vivo mit CCl ₄ - geschädigten Ratten	97
2.3.2	Isolierung und Kultur von Hepatozyten aus Ratten bzw. Mäusen	98
2.3.3	In-vitro-Test auf Leberschutzwirkung nach CCl ₄ - und GalN-Schädigung	102
a)	Bestimmung der durch CCl ₄ - induzierten Zellschädigung nach KISO et al. (1983a)	102
b)	Bestimmung der durch GalN- induzierten Zellschädigung nach KISO et al. (1983b)	102
c)	Bestimmung des Einflusses von Testsub- stanzen auf eine definierte GPT-Aktivität im Medium ohne Zellen	102
2.3.4	Messung der Protein-Synthese in isolierten Hepatozyten	103
2.3.5	Messung der RNA-Synthese in isolierten Hepatozyten	104
2.3.6	Isolierung und Reinigung von Zellkernen aus Rattenleber	104
2.3.7	Messung der RNA-Synthese in isolierten Zellkernen	105
2.3.8	Herstellung Estradiolrezeptor-haltiger Extrakte	105

2.3.9	Messung des Einflusses von EA-3 auf die Bindung von ^3H -Estradiol am Estradiolrezeptor aus Schweineuterus	106
2.3.10	EA-3-Metaboliten in der Leberzelle	106
2.3.11	Kultur von Alexander-Hepatom-Zellen	107
2.3.12	Messung der Aufnahme radioaktiver Vorstufen in Hepatozyten	108
2.3.13	Präparation der Liposomen	109
2.3.14	Messung der durch Cholat-induzierten ^3H -Inulin-Freisetzung aus Liposomen ohne und nach Silibininbehandlung	110
a)	mit Silibinin-haltigen Liposomen	110
b)	mit Liposomen, denen Silibinin im äußeren Medium zugesetzt wird	110
2.3.15	Messung der ATPase-Aktivität ohne und unter dem Einfluß von EA-3 und Silibinin	110
2.3.16	Autoradiographie von Leberschnitten aus ^3H -Silibinin-behandelten Ratten	111

IV. ZUSAMMENFASSUNG 112

V. LITERATUR 115

Abkürzungen 125

Lebenslauf 127

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler am Max-Planck-Institut für Biochemie in München-Martinsried angefertigt.

Für die stete Unterstützung und großzügige Förderung, die mir Herr Prof. Dr. J. Sonnenbichler bei der Durchführung dieser Arbeit zuteil werden ließ, möchte ich mich aufrichtig bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Wagner für das große Interesse an dieser Arbeit und seine stets wertvollen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Schafer danke ich für die Messung und Diskussion der Massenspektren.

Herrn Dr. G. Bovermann, Max-Planck-Institut für Biochemie und Herrn Prof. Dr. H. Scheer, Botanisches Institut der Universität München danke ich sehr für die Aufnahme bzw. Interpretation der CD-Spektren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. H. Hikino, Universität Tohoku, Sendai, Japan, für die Durchführung einer biologischen Testreihe.

Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche mit ATPase möchte ich Frau Dr. I. Mikiko, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München danken.

Darüberhinaus möchte ich Frau Dr. I. Zetl, Frau G. Schild, Frau H. Zielke, Frau I. Bliestle, Herrn M. Veth und Herrn H. Dieks danken, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

1. EINLEITUNG

Garcinia kola-HECKEL, zur Familie der Guttiferae gehorig, zählt zu den seit dem Altertum bekannten afrikanischen Arzneipflanzen.

G. kola ist ein großer Waldbaum, der in West- und Zentral-Afrika wächst (HUTCHINSON & DAZIEL, 1954). Als Trivialnamen sind im Gebrauch: Bitter-kola, Orogo (Yoruba), Edun (Bini), Okan (Ijaw), Efiari (Efik), Oju (Boki), Efiat (Ibibio) und Agbi-Ilu, Aki-Ilu, Adi, Ugolo (Igbo). Für wirtschaftliche Zwecke wird diese Pflanze vor allem in Nigeria kultiviert: die Rinde der jungen Bäume wird als Zahnputzmittel verwendet, die Nüsse werden zusätzlich zur echten Kolanuß (*Cola acuminata*) als Nahrungsmittel verwendet.

Die von uns untersuchte *Garcinia kola* Art (Abb. 1, S. 2) wächst als etwa 15 bis 20 m hoher Baum mit breiter Krone. Bei Verletzung gibt die braune, glatte, dicke Rinde einen gelben Saft ab. Die Blätter sind 5 bis 6 cm lang, 2 bis 3 cm breit, langlich ellipsoid und haben eine kurze scharfe Spitze. Das Gewebe macht einen lederartige Eindruck. Der Blattstiel ist dick, behaart und ca 1 cm lang. Die Bäume blühen in der Zeit von Dezember bis Januar, d.h. in dieser Region in der Mitte des Sommers. Die kurz gestielten Blüten sind grünlich-weiß. Sie stehen an der Spitze eines unbehaarten Blütenstandes. Die Narben sind klein und vierschenkelig. Die Fruchtknoten besitzen Haare.

Die Frucht ist ab Juli bis Oktober reif. Die runden Frucht sind grün mit glatter Oberfläche und haben einen Durchmesser von ca 8 bis 10 cm. Sie sind saftig und haben einen mehr oder weniger aromatischen Geruch. Zur Reife wechselt die Fruchtfarbe von grün nach orange. Die Früchte enthalten 2 bis 6 Nüsse, die sternförmig angeordnet sind. Sie sind ca 4 bis 5 cm lang und ellipsenförmig. Die mit einer braunen dünnen Schale umhüllten gelben Nüsse haben einen bitter adstringierenden Geschmack.



I



II



III

Abb. 1 Photographie des Habitus von *Garcinia kola*-HECKEL
in Nigeria : I Baum, II Fruchte und Blätter, III
Nusse

In der traditionellen nigerianischen Medizin haben Drogenauszüge aus den Nüssen ein breites Anwendungsspektrum. In erster Linie werden sie zur Behandlung von Lebererkrankungen (Hepatitis) und Geschlechtserkrankungen (Gonorrhoe) eingesetzt. In ihrer Anwendung stehen die entzündungshemmenden, wundheilungsfördernden und antimikrobiellen Wirkungen im Vordergrund.

Aus *G. kola* Nüssen sind folgende Verbindungen bereits isoliert worden : Biflavanone (COTTERILL & SCHEINMANN, 1978), Flavonglycoside (OLANIYI & PHILLIP, 1979), das Flavon Apigenin, das Flavonol Fisetin und das Biflavan Amentoflavin (IWU & IGBOKO, 1982), das Triterpenoid Cycloartenol (APLIN et al., 1967; MADUBUNYI, 1983), das Polyisoprenylbenzophenon Kolanon und Prenylconrauanalacton (MADUBUNYI, 1983).

Von Wagner (1981) und Mitarbeitern (FIEBIG, 1983; HIKINO et al., 1984) ist eine positive Wirkung von Flavonoiden auf den Leberzellmetabolismus beschrieben worden. Zur Pharmakologie und Biochemie der Inhaltsstoffe von *G. kola* konnte MADUBUNYI (1981) nach experimentellen Leberschädigungen durch Tetrachlorkohlenstoff an männlichen Ratten eine protektive Wirkung von Acetonextrakten aus *G. kola* Nüssen feststellen. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, daß bei oraler Gabe von getrockneten Aceton- und Ethanol-Extrakten sowohl eine protektive wie auch kurative Wirkung auch an weiblichen Meerschweinchen (*Cavia porcelus*) nach Leberintoxikation mit CCl_4 nachgewiesen werden kann.

Am Beginn dieser Arbeit war also eine Schutzwirkung gegenüber der durch Tetrachlorkohlenstoff induzierten Leberschädigungen in der Ratte und am Meerschweinchen durch Extrakte aus *G. kola* Nüssen bekannt. In diesem Zusammenhang ergab sich eine Reihe von Fragen :

1. Obwohl einige Inhaltsstoffe von *G. kola* schon chemisch

analysiert wurden, fehlten Aussagen über die Struktur der leberaktiven Verbindungen.

2. Unbekannt war weiterhin, welche Effekte die Garcinia-Extrakte bzw. die gereinigten Inhaltsstoffe auf den Leberstoffwechsel ausuben. In diesem Zusammenhang wird der Einfluß der gereinigten Wirkstoffe auf die RNA- und Protein-Synthese in Hepatozyten und in isolierten Zellkernen beschrieben werden. Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der antihepatotoxischen Garcinia-Inhaltsstoffe in der Leberzelle wird diskutiert.
3. Wie gezeigt werden wird, ist der Precursoreinstrom in die Leberzelle und sein Einbau in neusynthetisierte Makromoleküle unter dem Einfluß höherer Konzentrationen Garcinia-Flavonoide vermindert. Es war deshalb notwendig, die Frage zu klären, inwieweit die "Garcinia-Flavonoide" die Membranpermeabilität in Leberzellen beeinflussen. In Ratten- und Maus-Hepatozyten, sowie in menschlichen Hepatomzellen der Zelllinie Alexander (ALEXANDER et al., 1976) wird ihr Effekt auf die Aufnahme einiger Makromolekül-Bausteine (Uridin, Methionin, Thymidin) und anderer niedermolekularer Verbindungen (Galactosamin, α -Aminoisobutyrate, Calcium-Ionen) untersucht.
Im Zusammenhang mit den Fragen zur Beeinflussung der Membranpermeabilität werden auch einige Experimente mit Liposomen beschrieben, die auf die Natur der Flavonoid-Membran-Interaktion Hinweise geben.

II. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Isolierung und Identifizierung der biologisch aktiven Verbindungen aus *Garcinia kola* Nüssen

Um leberwirksame Pharmaka aus Pflanzen zu isolieren, sind neben der chemischen Aufarbeitung und Fraktionierung biologische Testsysteme notwendig, die das Vorhandensein und eine eventuelle Anreicherung der aktiven Verbindung(en) anzeigen können.

1.1 Auswahl der biologischen Testmethoden

Da Lebererkrankungen sehr verschiedenartige Ursachen haben können und sich in mannigfachen Krankheitsbildern äußern - die Pathologie nennt nicht weniger als 20 Formen von Lebererkrankungen - ist es nicht einfach, geeignete Tier- bzw. Versuchsmodelle zu finden, mit denen die pharmakologische Wirksamkeit eines Drogenextraktes oder einer isolierten Verbindung ermittelt werden kann. Grundsätzlich bieten sich mehrere Methoden an. Zwei in dieser Arbeit verwendete werden nachstehend skizziert.

a) Bei der ersten Methode wird ein in-vivo-Leberschaden durch Verabreichen von lebertoxischen Verbindungen wie CCl_4 verursacht und zusätzlich versucht, diesen Schaden prophylaktisch oder kurativ zu antagonisieren. Bei Gabe von narkotisierenden Stoffen kann eine gesunde Leber das Schlafmittel relativ schnell metabolisieren und unwirksam machen, nicht dagegen eine geschädigte Leber. Schlafzeitmessungen nach Narkose können deshalb als Leberfunktionsprüfung eingesetzt

werden.

b) Im Vergleich zur komplexen Situation im lebenden Tier (Resorptionsvorgang, circadianer Rhythmus usw.), kann die antihepatotoxische Wirkung einer Droge in einer Zellkultur mit isolierten Hepatozyten wesentlich einfacher gemessen werden. Bei den in-vitro-Modellen kann die Pharmakokinetik und die Bioverfügbarkeit weitgehend unberücksichtigt bleiben. Positive Ergebnisse werden allerdings auch durch Verbindungen erhalten, die allein durch Reaktion mit den Hepatotoxinen deren Inaktivierung bewirken. In dem in dieser Arbeit verwendeten Test bedient man sich isolierter Hepatozyten in Kultur und bestimmt nach Schädigung und eventueller Antagonisierung des Defektes die Freisetzung leberspezifischer Enzyme z.B. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). Geschädigt wird in diesem Test durch CCl_4 oder Galactosamin. Gemessen wird die Freisetzung von GPT. Je nach hepatoprotektiver Potenz einer Substanz wird die GPT-Freisetzung mehr oder weniger stark gehemmt. Bezogen werden die Meßwerte (Enzymaktivität in U/l) auf den mit 100 % angesetzten GPT-Spiegel der Kontrollen nach reiner Schädigung mit CCl_4 oder GalN. Man spricht von starker antihepatotoxischer Aktivität einer Droge bei Werten von weniger als 50 % der Kontrollen.

Das Flavonolignan Silibinin aus der Mariendistel *Silybum marianum* ist seit langem als antihepatotoxische Droge bekannt (HAHN et al., 1968; VOGEL, 1968; SCHOPEN et al., 1969; VOGEL & TEMME, 1969; WEIL & FRIMMER, 1970; HAMMERL et al., 1971; POSER, 1971). Zur Überprüfung der in-vivo- und in-vitro-Systeme wurden deshalb stets Versuche mit Silibinin als Referenzsubstanz durchgeführt.

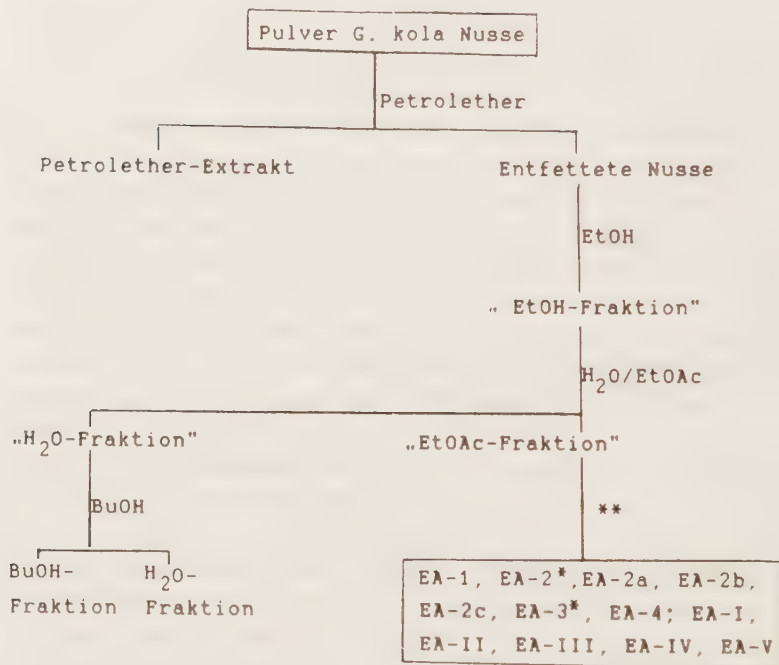
1.2 Rohfraktionierung der Inhaltsstoffe aus *Garcinia kola* Nüssen

Als erster Schritt zur Isolierung der Inhaltsstoffe von *G. kola* Nüssen mit antihepatotoxischer Wirkung wurde durch selektive Extraktionen fraktioniert.

Zweckmäßig war eine Zerkleinerung der getrockneten Nusse. Das Pulver wurde mit Petrolether entfettet und zuerst mit 70 % EtOH extrahiert. Der eingetrocknete EtOH-Gesamtextrakt wurde in H₂O suspendiert und mit EtOAc ausgeschüttelt (siehe Schema I, S.8 und Schema II, S.92). Aus 1 kg gepulverter Nusse erhält man 158 g einer braunen schmierigen "EtOH-Fraktion". Daraus erhält man durch Extraktion mit EtOAc und nach Trocknung dieses Extrakts 40 g dunkelbraune pulverisierbare trockene "EtOAc-Fraktion". Die gelbschmierige "H₂O-Fraktion" beträgt 110 g. Diese Wasserphase wurde erschöpfend mit n-Butanol (BuOH) ausgeschüttelt. Auf diese Weise ergeben sich 5.8 g einer gelben Fraktion (= 3.7 % der EtOH-Fraktion).

Die organischen Fraktionen und der wäßrige Rückstand wurden dunnschichtchromatographisch analysiert. Nach DC besteht die EtOAc-Fraktion aus 12- und die BuOH-Fraktion aus 4 Verbindungen (Abb.2, S.11).

Schema I : Fraktionierung der Inhaltsstoffen aus *G. kola* Nüssen



* : leberaktive Garcinia-Inhaltsstoffe

** : Säulen- und Dunnschichtchromatographie an Kieselgel

1.3 Beeinflussung der durch CCl_4 verursachten Schlafzeitverlängerung in Ratten durch die Extrakte aus *Garcinia kola* Nussen

Wie in Abschnitt 1.1 dargestellt, beruht das Prinzip dieses Tests auf einer Schädigung der Leber durch CCl_4 . Eine nach 24 h durchgeführte i.p. Hexobarbital-Injektion führt zur Narkotisierung der Versuchstiere. Die Stärke der vorhandenen Leberschädigung drückt sich in einer verlängerten Schlafdauer der Tiere aus, da Hexobarbital ausschließlich durch Leberenzyme inaktiviert wird und deren Aktivität wiederum entsprechend dem Grad des Leberschadens herabgesetzt ist. Vollständige oder teilweise Antagonisierung des Leberschadens bewirkt eine Verkürzung der Schlafzeit.

Der EtOH-Gesamtextrakt, die EtOAc- und BuOH-Fractionen aus *G. kola* Nussen wurden getestet (vgl. II.1.1). Silibinin diente als Vergleichssubstanz.

Sowohl der Gesamtextrakt als auch die genannten Fractionen führten zu einer Schlafdauerverkürzung der Tiere. Die durchschnittliche Schlafdauer der Ratten ist in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1 Antagonisierung der mit CCl_4 induzierten Schlafzeitverlängerung in Ratten ($n=10$) durch die Extrakte aus *Garcinia kola* Nussen

Substanz	Durchschnittliche Schlafdauer (min)	Antagonisierung der Schlafzeitverlängerung(%)
CCl_4 /Paraffin-Gemisch per os	49.00 ± 1.20	0
Kontrolle 1 (0.9 % NaCl)	21.30 ± 0.50	} = 100
Kontrolle 2 (reines Paraffin)	21.70 ± 1.00	
Kontrolle 3 (Tween 60)	21.95 ± 1.20	
EtOH-Extrakt/ CCl_4	25.40 ± 3.00	85
EtOAc-Fraktion/ CCl_4	22.00 ± 1.56	94
BuOH-Fraktion/ CCl_4	34.00 ± 2.10	54
Silibinin/ CCl_4	23.50 ± 2.88	92

Aus Tab. 1 geht hervor, daß das Substanzgemisch in der EtOAc-Fraktion eine stärkere Wirkung zeigt (94 % Antagon.) als der EtOH-Gesamtextrakt (85 % Antagon.) bzw. die BuOH-Fraktion (54 % Antagon.). Damit sollte das Hauptwirkprinzip der *G. kola* Nusse im Bereich der apolaren Verbindungen angereichert sein. Es scheint aber in der BuOH-Fraktion immer noch vorhanden zu sein.

1.4 Isolierung der leberaktiven Verbindungen aus *Garcinia kola* Nüssen

In-vivo-Teste mittels Schlafdauerverlängerung hatten auf das Vorhandensein der Wirkprinzipien der *G. kola* Nüsse in der EtOAc-Fraktion hingewiesen. Wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben wird, zeigt diese Fraktion auch in anderen Testsystemen in vitro eine hepatoprotektive Wirkung. Deshalb sollten die Komponenten, die für den beobachteten Einfluß verantwortlich sind, durch weitere Fraktionierung isoliert und dann identifiziert werden.

1.4.1 Chromatographische Analyse

Ein dunnschichtchromatographischer Vergleich der EtOH-Fraktion mit dem der EtOAc- und BuOH-Fractionen ergab folgendes Bild (Abb. 2).

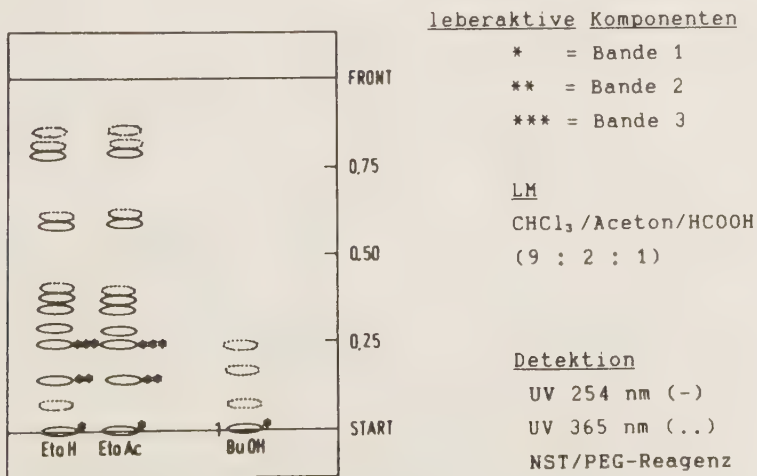


Abb. 2 DC-Vergleich der EtOH-Fraktion mit den EtOAc- und BuOH-Fractionen aus dem EtOH-Gesamtextrakt

In der EtOAc-Fraktion sind unter anderem zwei homogen erscheinende Zonen nachzuweisen, die nach aufsteigendem R_f -Wert als Banden 2 und 3 bezeichnet werden. Am Start ist eine heterogen erscheinende Zone detektierbar, die Bande 1 genannt wird. Während die Banden 2 und 3 eine stark dunkelblaue Fluoreszenz bei 254 nm zeigen, gibt Bande 1 eine dunkelbraune Färbung.

Die Banden 1, 2 und 3 stellen quantitativ die Hauptanteile der EtOAc-Fraktion dar und beinhalten - wie nachstehend gezeigt wird - die gesuchten biologischen Aktivitäten. Bande 1, die nach MeOH-Extraktion im Laufmittel EtOAc/ CH_3COOH / $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$ (100:11:11:26) einer DC-Analyse unterworfen wurde, beinhaltet noch 4 Hauptverbindungen, die allerdings auch in den EtOAc- und EtOH-Fraktionen anteilig sind (Abb.3).

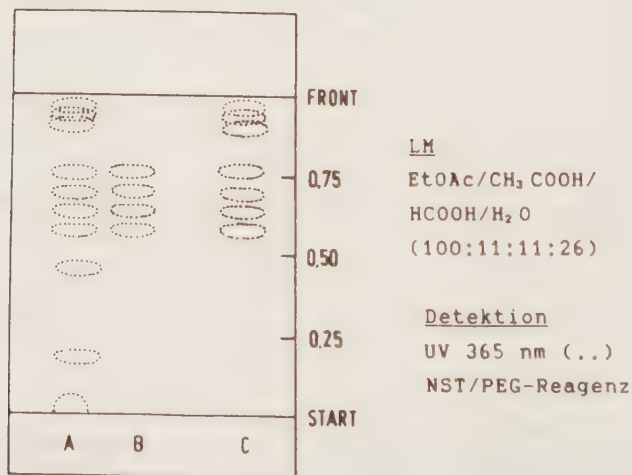


Abb. 3 Auftrennung und DC-Vergleich der **Bande 1** (B) mit den EtOAc- (C) und EtOH- (A) Fraktionen

1.4.2 Preparative Auftrennung der "aktiven Verbindungen" der EtOAc-Fraktion

Die preparative Auftrennung der EtOAc-Fraktion erfolgte über Kieselgelsäulen unter sukzessiver Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln (LM 1, LM 2, LM 3, LM 4 und LM 5) (vgl. S.93) zur Elution. Die Eluate wurden auf Grund ihrer DC-Bilder in 3 Fraktionen zusammengefaßt :

Fraktion I : Gemisch, das keine der Banden 1, 2 und 3 enthält; Fraktion II : Gemisch, das die Banden 2 und 3 enthält; Fraktion III : Gemisch, das die Bande 1 enthält (Abb. 4).

Damit standen für die weitere Auftrennung drei Fraktionen zur Verfügung.

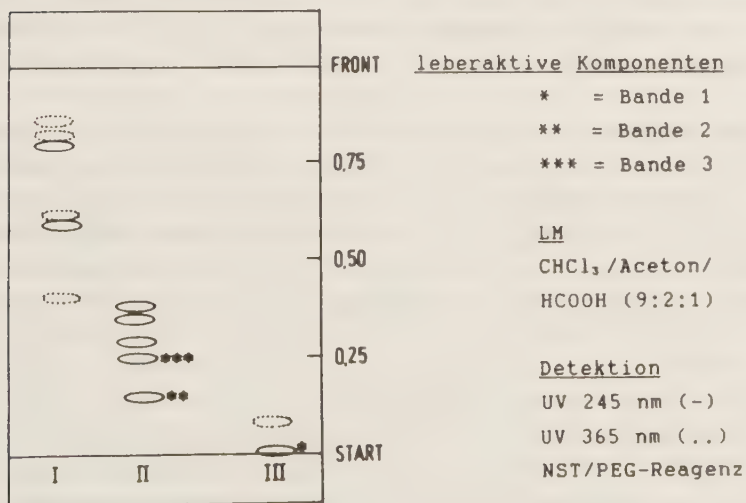


Abb. 4 DC-Analyse der säulenchromatographischen Fraktionen I, II und III

1.4.3 Reindarstellung der Inhaltsstoffe der EtOAc-Fraktion durch präparative Dünnschichtchromatographie

Die Reindarstellung der Verbindungen der Fraktion II aus dem EtOAc-Extrakt wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten von 0.5 mm Schichtdicke durchgeführt. Für eine gute Auftrennung (4 mg pro Platte) erwies sich eine viermalige stufenformige Entwicklung in sukzessiven Abständen von 5 cm, 6.5 cm, 8.5 cm und 10 cm am geeignetsten. Dabei wurde das von DIESEL (1974) entwickelte System $\text{CHCl}_3 / (\text{CH}_3)_2\text{CO} / \text{HCOOH}$ (9:2:1) als Laufmittel verwendet. Der Zusatz von Säure war notwendig, da ohne diesen die Auftrennung durch Überlappung stark beeinträchtigt wird, offensichtlich als Folge dissoziabler OH-Funktionen. Für das präparative Arbeiten bedeutete der Säureanteil die Gefahr der partiellen Hydrolyse bzw. Zersetzung. Ein analytischer DC-Vergleich der isolierten Verbindungen mit der EtOAc-Fraktion aus der Kieselgelsäule zeigte allerdings keine Zersetzung an.

Von der Fraktion II wurden aus den Kieselgelplatten nach Elution die Verbindungen EA-1, EA-2, EA-2a, EA-2b, EA-2c, EA-3, EA-4, EA-5 und EA-6 erhalten. Auf ähnliche Weise wurden aus Fraktion III der EtOAc-Fraktion nach Auftrennung über Kieselgelplatten und Elution die Verbindungen EA-I, EA-II, EA-III, EA-IV und EA-V isoliert.

1.5 Einfluß der Rohextrakte und der gereinigten Inhaltsstoffe aus G.kola Nüssen auf die durch CCl_4 - oder GalN- bedingte Enzymfreisetzung aus Hepatozyten

Der hepatoprotektive Effekt der Rohfraktionen aus G.kola Nüssen, sowie der isolierten reinen Substanzen wurde zusätzlich im in-vitro- CCl_4 - und GalN-Hepatozyten-Modell nach KISO et al. (1983a; 1983b) (vgl.III.1.1) überprüft. KISO et al. benutzen wie in Abschnitt 1.1 dargestellt zur quantitativen Bewertung von Leberzellschäden bzw. deren Antagonisierung die mit den Zelldefekten einhergehende Freisetzung leberspezifischer Enzyme, wie dies auch in der klinischen Diagnostik analysiert wird. Die durch CCl_4 - oder GalN- bedingte GPT-Freisetzung in Ratten-Hepatozyten ist relativ einfach zu analysieren.

Wegen der geringen Mengen der isolierten reinen Verbindungen, die zur Verfügung standen, konnten nur die Hauptverbindungen getestet werden. Silibinin diente wiederum als Vergleichssubstanz (Tab. 2).

Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, ubt die EtOAc-Fraktion sowohl im CCl_4 - als auch im GalN-Modell eine starke Schutzwirkung gegenüber beiden Noxen aus. Die BuOH-Fraktion zeigt ebenfalls eine signifikante Hemmung der GPT-Freisetzung im GalN-Modell. Vergleicht man die Ergebnisse dieses Hepatozytentests mit dem Schlafzeittest (Tab. 1), so wird deutlich, daß die Ergebnisse beider Tests im großen und ganzen gut korrelieren. Das Hauptwirkprinzip der G. kola Nüsse ist im Bereich der apolareren Verbindungen in den EtOAc-Fractionen enthalten.

Tab. 2 GPT-Freisetzung nach CCl_4 - oder GalN-Schädigung von Ratten-Hepatozyten durch Extrakte und die gereinigten Komponenten aus *G. kola* Nüssen. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen; signifikante Unterschiede zur Kontrolle : wirksam, $p < 0.01^*$ oder $p < 0.001^{**}$

Substanz	Dosis(mg/ml)	CCl_4 (GPT %)	GalN(GPT %)
Kontrolle	-	100 ± 5	100 ± 6
EtOAc-Fraktion	1.0	14^{**}	34^{**}
BuOH-Fraktion	1.0	89	67*
EtOH-Extrakt	1.0	51*	83
EA-2	1.0	$27 \pm 3^{**}$	$68 \pm 2^*$
	0.1	89 ± 4	96 ± 5
EA-3	1.0	$8 \pm 2^{**}$	$51 \pm 4^*$
	0.1	90 ± 3	94 ± 2
EA-4	1.0	87 ± 2	92 ± 5
	0.1	89 ± 3	94 ± 2
EA-II	1.0	95 ± 3	84 ± 6
	0.1	94 ± 2	93 ± 4
EA-III	1.0	$61 \pm 2^*$	86 ± 3
	0.1	99 ± 6	91 ± 2
Silibinin	1.0	$33 \pm 3^{**}$	$75 \pm 6^*$
	0.1	91 ± 5	98 ± 4

Kontrolle : Freisetzung von GPT aus Leberzellen in Gegenwart von 0.4 mM GalN- bzw. 10 mM CCl_4 in 1 ml Suspension mit 5.0×10^6 Hepatozyten = 100 %.

Ich danke Prof. Hikino, Universität Tohoku, Sendai, Japan, für die Durchführung der obigen Testreihe.

Die Reinsubstanzen EA-3 und EA-2 bewirken im CCl₄-Modell eine starke Inhibierung der CCl₄-induzierten GPT-Freisetzung. EA-3 verhindert die GPT-Freisetzung ca 4 x stärker als das Flavanolignanderivat Silibinin, dessen protektive Wirkung gegenüber zahlreiche Lebergiften zusätzlich in vielen anderen Testmodellen bewiesen wurde (HAHN et al., 1968; VOGEL, 1968; SCHOPEN et al., 1969; VOGEL & TEMME, 1969; WEIL & FRIMMER, 1970; HAMMERL et al., 1971; POSER, 1971; HIKINO et al., 1984).

Auch im GalN-Modell besitzt EA-3 die stärkste Hemmwirkung auf die GPT-Freisetzung. Somit kann besonders EA-3 als eine potentiell leberschutzwirksame Droge betrachtet werden.

Im GalN- bzw. CCl₄-Modell korreliert die Aktivität der gesamten EtOAc-Fraktion nicht mit der Aktivität von EA-3 sowie EA-2 oder EA-III allein. Die sehr starke Wirkung der EtOAc-Fraktion dürfte durch ein Zusammenwirken der Komponenten zustandekommen, wobei allerdings nach den bisherigen Ergebnissen der Verbindung EA-3 die Hauptwirkung zukommen sollte. EA-III zeigt auch noch eine nennenswerte Aktivität.

Die anderen Garcinia-Verbindungen zeigen weder im CCl₄- noch im GalN-Modell eine Inhibierung des GPT-Austritts.

Ein positives Ergebnis könnte aber dadurch vorgetauscht werden, daß die zugesetzten Testsubstanzen selbst eine Hemmung des nachzuweisenden Enzyms GPT bewirken. Zur Kontrolle wurde deshalb der mögliche Einfluß der zu testenden Verbindungen auf die GPT-Aktivität untersucht (Tab. 3).

Tab. 3 Wirkung der leberaktiven Garcinia-Flavonoide EA-2 und EA-3 (je 0,2mg) auf die GPT-Aktivität (2440 U/l, 50 μ l) im standardserumhaltigen Medium RPMI-1640 nach 30 minutiger Inkubationszeit. Kontrolle : GPT-Aktivität im Kulturmedium (200 μ l) ohne Einfluß von Testsubstanzen = 100%

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT (U/l)	GPT (%)
Kontrolle	-	306	100
EA-2	1.0	239	78
EA-3	1.0	294	96

Die Tabelle 3 zeigt, daß bei EA-3 kein bemerkenswerter Einfluß auf die Enzymaktivität gemessen werden kann. Die Absenkung der GPT-Freisetzung durch EA-3 im "antihepatotoxischen Test" der Tab. 2 liegt bei 1 mg/ml immerhin bei 92 % und 49 % gegenüber dem hier gemessenen Wert von 4 % Enzymdesaktivierung. Anders verhält es sich allerdings bei EA-2, wo ein "antihepatotoxischer Effekt" von 73 % bzw. 32 % (Tab. 2) einer Enzymdesaktivierung von 22 % gegenübersteht. Eine Signifikanz scheint in diesem Fall nur bei der Schädigung mit CCl₄ gegeben zu sein.

1.6 Untersuchungen zur chemischen Struktur der biologisch aktiven Inhaltsstoffe aus *Garcinia kola* Nussen

Wie vorausgehend gezeigt wurde, zeigen neben der Vergleichssubstanz Silibinin besonders die Verbindungen EA-3 und EA-2 eine Wirkung auf Leberzellen. Die Strukturaufklärung dieser Substanzen war deshalb von vorrangigem Interesse.

1.6.1 Identifizierung der Verbindungen EA-2 und EA-3 als Flavanonole durch Farbreaktionen

Durch spezifisch für Flavonoide entwickelte Farbreaktionen nach SHINODA (1928) und PEW (1948) konnten die Verbindungen EA-2 und EA-3 in der Gruppe der Flavanonole eingeordnet werden.

1.6.2 UV-Spektren

Die UV-Spektren (s. S.96,97) von EA-2 mit einem Hauptmaximum bei 293 nm sowie EA-3 mit einem Maximum bei 293.1 nm zeigen in ihrem Kurvenverlauf das typische Bild eines Acylphloroglucinolchromophors wie er z.B. beim Flavanon Naringenin (JOSHI et al., 1970) vorliegt.

Auf Zugabe von AlCl_3 erfolgt eine bathochrome Verschiebung des Maximums (bei EA-2 um 23 nm und bei EA-3 um 22.50 nm), die sich auch bei darauffolgender Zugabe von HCl als beständig erwies. Dieses Verhalten ist ein sicheres Zeichen dafür, daß eine freie OH-Gruppe an den C-Atomen 5 oder 3 neben einer C-4-Ketogruppe im Molekül vorliegt (MARKHAM, 1982).

Versetzt man die methanolischen Meßlösungen mit Natriumacetat, so verschieben sich die Maxima bei EA-2 nach 332 nm und bei EA-3 nach 330.75 nm, wie bei Naringenin (JOSHI et al., 1970) und Dihydrokaempferol (SESHADRI, 1962). Daraus kann geschlossen werden, daß neben einer 5-OH- auch eine freie 7-OH-Gruppe vorliegt. Damit wird als Grundgerüst die Struktur eines 5,7-Dihydroxyflavanons wahrscheinlich.

1.6.3 IR-Spektren

Die IR-Spektren (Abb. 5a, 5b) mit Hauptbanden bei 3340 cm^{-1} bzw. 3362 cm^{-1} (OH) und 1630 cm^{-1} (C=O) entsprechen ebenfalls dem oben genannten Strukturtyp. Im Fingerprint-Bereich zwischen 1500 bis 800 cm^{-1} ähneln die Spektren in starkem

Maße denen der Flavanone, so daß zumindest Teilstrukturen jener Verbindungsklasse zu erwarten sind.

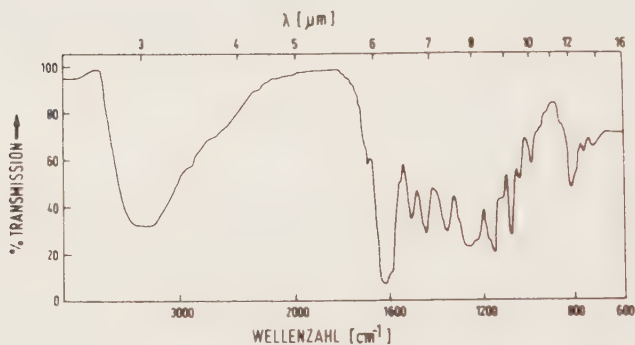


Abb. 5a IR-Spektren von EA-2

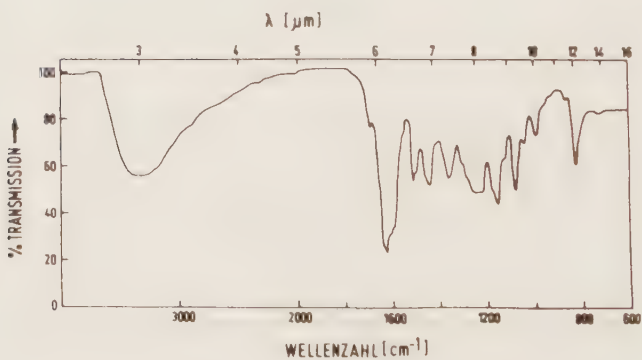


Abb. 5b IR-Spektren von EA-3

1.6.4 Massenspektren

Im Massenspektrum erscheint der Molekülpeak für EA-2 (Abb. 6a) bei m/e 574 und für EA-3 (Abb. 6b) bei m/e 558. Die relative Molekülmasse von EA-2 und EA-3, sowie deren molare Extinktionskoeffizienten sind etwa zweimal so groß wie die Werte von typischen Flavanonen, z.B. Naringenin (JOSHI et al., 1970). Demnach konnten sowohl EA-2 wie auch EA-3 aus zwei Flavanon-Molekülen (Biflavanone) bestehen.

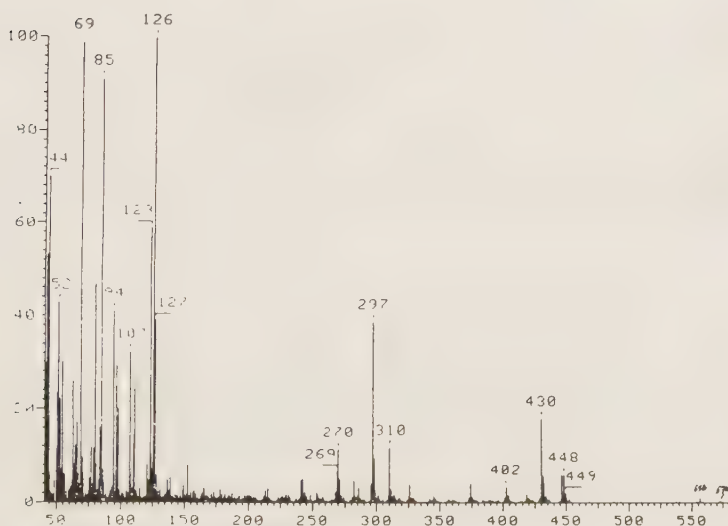


Abb. 6a Massenspektrum von EA-2

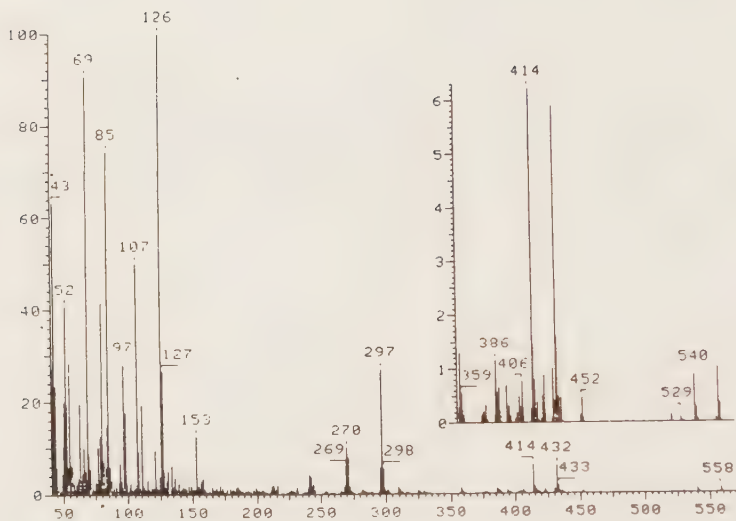


Abb. 6b Massenspektrum von EA-3

Aus dem Fragmentierungsmuster unterhalb von m/e 126 läßt sich eindeutig die Anwesenheit der Phloroglucinoleinheit erkennen. Die Ionen m/e 107 und 123 beweisen die Anwesenheit eines Monohydroxy- und Dihydroxybenzolsystems in EA-2. In EA-3 fehlt jedoch das Ion bei m/e 123.

1.6.5 NMR-Spektren

Zur Bestimmung der chemischen Strukturen von EA-2 und EA-3 wurden 500 MHz NMR-Spektren gemessen. Das Spektrum von EA-3 ist in Abb. 7 wiedergegeben. Die Parameter für EA-3 bzw. EA-2 sind in der Tab. 4 bzw. Tab. 5 aufgelistet und den Strukturformeln auf S.28 zugeordnet.

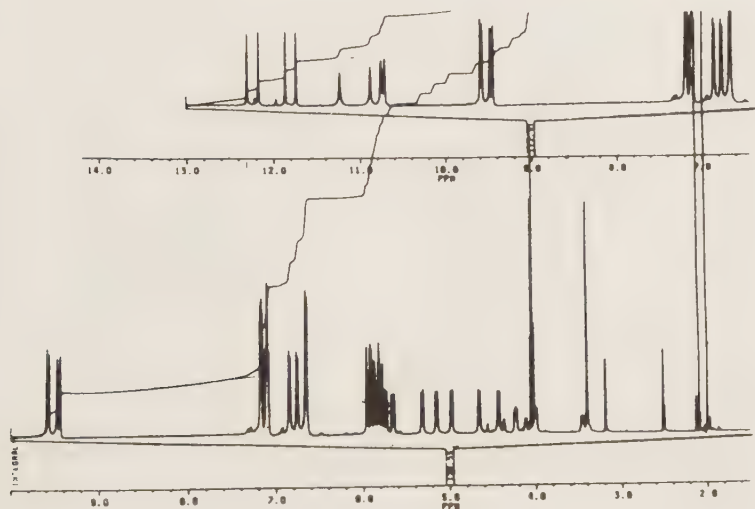


Abb. 7 NMR-Spektrum von EA-3 in d_6 -DMSO bei 25 °C (500 MHz)

Tab. 4 NMR-Daten von EA-3 in d_6 -DMSO bei 25 °C

Protonen am	ppm-Werte	Anzahl	Kopplung
I-A 6	* 5.83/5.78	1	
I-A 8	* 5.97/5.87	1	
II-A 6	5.91	1	
I-B 2'	6.85 oder 6.65	1	d (J ca 8 Hz)
I-B 3'	7.17	1	d (J ca 8 Hz)
I-B 5'	7.17	1	d (J ca 8 Hz)
I-B 6'	6.65 oder 6.85	1	d (J ca 8 Hz)
II-B 2'	6.65 oder 6.75	1	d (J ca 8 Hz)
II-B 3'	7.10	1	d (J ca 8 Hz)
II-B 5'	7.10	1	d (J ca 8 Hz)
II-B 6'	6.75 oder 6.65	1	d (J ca 8 Hz)
I-C 2	* 5.65/5.32	1	d (J ca 11 Hz)
I-C 3	* 4.42/4.64	1	d (J ca 11 Hz)
II-C 2	* 5.14/4.97	1	d (J ca 11 Hz)
II-C 3	* 5.22/5.08	1	d (J ca 11 Hz)

austauschbare

OH-Gruppen

ppm-Werte

phenolische OH

I-A 5	}	* 12.30/12.17; * 11.86/11.74; * 11.23/10.87; * 10.75/10.71; * 9.58/9.56; * 9.47/9.44
I-A 7		
II-A 5		
II-A 7		
I-B 4'		
II-B 4'		

alkoholisches OH

II-C 3	* 5.83/5.73	d (J = 6 Hz)
--------	-------------	--------------

* : das Proton erscheint an zwei verschiedenen Lagen;

d : Dublett

Die miteinander in starker energetischer Wechselwirkung stehenden Protonen wurden durch H/H-Korrelationsspektroskopie analysiert (Abb. 8).

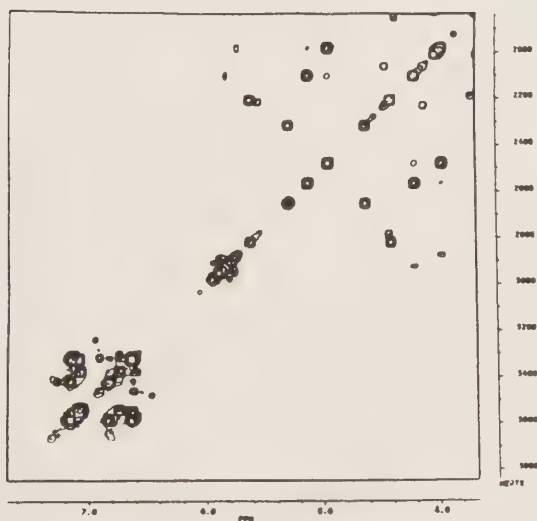


Abb. 8 H/H-Korrelationsspektrum von EA-3 in DMSO bei 25 °C (500 MHz)

Folgende Protonen koppeln miteinander : I-A 6 mit I-A 8 (5.83 mit 5.97; 5.78 mit 5.87), I-C 2 mit I-C 3 (5.65 mit 4.42; 5.32 mit 4.64), II-C 2 mit II-C 3 (5.14 mit 4.22; 4.97 mit 3.98).

Tab. 5 NMR-Daten von EA-2 in d_6 -DMSO bei 25 °C

Protonen am	ppm-Werte	Anzahl	Kopplung
I-A 6 } I-A 8 } II-A 6 }	5.8-5.9	3	
I-B 2'	6.76	1	
I-B 3'	ca 7.11	1	
I-B 5'	ca 7.11	1	
I-B 6'	6.66	1	
II-B 2' } II-B 5' } II-B 6' }	6.6-6.9	3	
I-C 2	* 5.68/5.36	1	d(J ca 12 Hz)
I-C 3	* 4.48/4.66	1	d(J ca 12 Hz)
II-C 2	* 4.89/5.01	1	d(J ca 12 Hz)
II-C 3	* 3.97/4.20	1	d(J ca 12 Hz)

austauschbare

OH-Gruppen	ppm-Werte
------------	-----------

phenolische OH

I-A 5 } I-A 7 } II-A 5 } II-A 7 } I-B 4' } II-B 3' } II-B 4' }	* 12.22/12.14; * 11.85/11.76; * 11.20/10.90; * 10.75/10.70; * 9.56/9.49; * 9.12/8.93; * 8.96/8.84
--	--

alkoholisches OH

II-C 3	5.70	d (J ca 6 Hz)
--------	------	---------------

* : das Proton erscheint an zwei verschiedenen Lagen;

d : Dublett

Nach dem Korrelationsspektrum von EA-2 koppeln folgende Protonen miteinander : I-C 2 mit I-C 3 (5.68 mit 4.48; 5.36 mit 4.66) ; II-C 2 mit II-C 3 (4.89 mit 3.97; 5.01 mit 4.20).

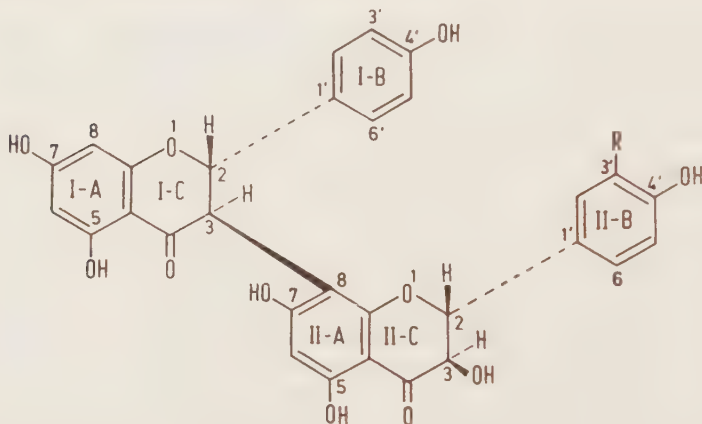
Im Bereich von 12.2 bis 9.44 ppm des EA-3-Spektrums (S.23) findet man 6 phenolische OH-Gruppen, die allerdings alle doppelt mit halber Intensität auftreten. Letzteres gilt auch für andere Protonenresonanzen (siehe unten), sodaß man auf ein Gemisch zweier sehr ähnlicher Stereoisomeren schließen muß. Bei 5.83 bzw. 5.73 ppm erscheint noch je ein halbes austauschbares alkoholisches OH. 8 aromatische Protonen kommen im Bereich 7.2 bis 6.6 ppm. 3 weitere aromatische Protonen werden im Bereich 6 bis 5.7 ppm sichtbar. Zwischen 5.65 bis 3.98 ppm liegen 4 Protonenresonanzen, die wieder doppelt mit je halber Intensität erscheinen. Das Proton bei 4.22 bzw. 3.98 ppm koppelt mit dem benachbarten alkoholischen Proton. Somit ergeben sich als Protonenanzahl für EA-3 22 (11 aromatische, 4 alicyclische und 7 mit D₂O austauschbare) Protonen.

Die doppelt auftretenden Signale (*) kann man durch die Existenz von Stereoisomeren erklären (s. S.32), die bei EA-3 im Komponentenverhältnis 1:1 vorliegen.

Die NMR-Spektren von EA-2 (Tab. 5, S.26) zeigen, daß EA-2 und EA-3 zum großen Teil recht ähnlich sind. Unterschiede findet man in der Anzahl der phenolischen OH-Gruppen : (bei EA-3 6 OH, bei EA-2 7 OH) und bei den aromatischen Wasserstoffen der B-Ringe (bei EA-3 8H, bei EA-2 7 H). Auch EA-2 liegt als Stereoisomerenpaar im Komponentenverhältnis 1:3 vor.

1.6.6 Die chemischen Strukturen von EA-3 und EA-2

Durch die Analyse der NMR-Parameter unter Einbeziehung der UV-, IR-, und MS-Daten wurden für EA-3 und EA-2 die nachstehenden Strukturformeln ermittelt.



EA-2 (R = OH) : II-3,II-3',I-4',II-4',I-5,II-5,I-7,II-7-octahydroxy(I-3, II-8)biflavanonol;

EA-3 (R = H) : II-3,I-4',II-4',I-5,II-5,I-7,II-7-heptahydroxy(I-3,II-8) biflavanonol.

Diese Nomenklatur entspricht nicht den **IUPAC Regeln**, erleichtert aber die Zuordnung der einzelnen spektroskopische Daten. Die korrekten Bezeichnungen sind für :

EA-2 : 2'-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2,2',3,3'-tetrahydro-3',5',5',7,7'-pentahydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3,8'-bi-4*H*-1-benzopyran-4,4'-dion.

EA-3 : 2,2',3,3'-Tetrahydro-3',5,5',7,7'-pentahydroxy-2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)-3,8'-bi-1-4*H*-benzopyran-4,4'-dion.

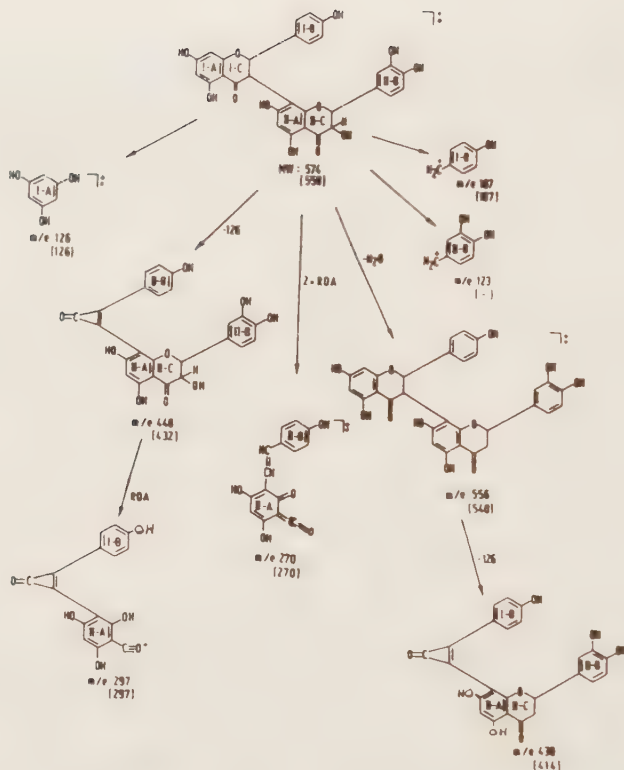
In den Formeln von EA-3 bzw. EA-2 sind die Strukturanteile von Naringenin und Aromadendrin bzw. Taxifolin zu erkennen.

Die Flavanonol-Grundstruktur wird bestätigt durch die Resonanzsignale der Protonen an II-C 2 (5.14 und 4.97 ppm), die mit II-C 3 Dubletts ($J = 11$ Hz) geben. Die Wasserstoffe an II-C 3 (4.22 und 3.98 ppm) zeigen eine zusätzliche Kopplung zu dem aliphatischen OH (5.83 und 5.73 ppm). Diese zusätzliche Aufspaltung verschwindet beim Deuterieren. Weitere Flavanon-Protonen erscheinen für I-C 2 bei 5.32 und 5.65 ppm und I-C 3 bei 4.64 und 4.42 ppm, die als Dubletts mit jeweils 11 Hz koppeln. Die Verknüpfungsstelle mit dem Flavanonolteil an I-C 3 ist dadurch gesichert, daß am I-C 3 nur 1 H sitzt und durch die Substitution mit dem Aromaten die Resonanz des I-C 3 Wasserstoffs nach niederem Feld verschoben wird.

Die Verbindung der Ringe I-C mit I-B sowie II-C mit II-B ist zusätzlich rotationsgehindert (I-B 2 und I-B 6 sowie II-B 2 und II-B 6 zeigen unterschiedliche ppm-Werte).

Die Massenspektren von EA-2 und EA-3 bestätigen die ermittelten Strukturformeln, die durch folgendes Fragmentierungsschema (S.30) gut belegt werden können. Bruchstücke von EA-3 sind in Klammern.

Das intensive Fragment m/e 126 des Massenspektrums von EA-2 bestätigt das Vorliegen eines Flavanonsystems, dessen Aromaten I-A und II-A je zwei OH-Gruppen enthalten. Die Ionen m/e 107 und m/e 123 beweisen die Anwesenheit eines Monohydroxy- und Dihydroxybenzolsystems für die Ringe I-B und/oder II-B. Die durch Retro-Diels-Alder-Fragmentierungen aus dem Molekülion entstehenden Fragmente m/e 270 und m/e 297 zeigen, daß der Ring I-B mit einer OH-Gruppe substituiert ist. Demnach muß der Ring II-B ein Dihydroxybenzolsystem enthalten.



Das Massenspektrum von EA-3 ist analog dem von EA-2 zu deuten. Das Molekulation und einige charakteristische Fragmente (m/e 414 und 432) sind um 16 ME leichter als die entsprechenden Ionen im Spektrum von EA-2. Schließlich fehlt das Ion bei m/e 123, das für ein Dihydroxybenzolsystem im Ring I-B/II-B charakteristisch ist. Das vergleichsweise intensive Ion bei m/e 107 deutet darauf hin, daß in EA-3 beide Ringe B mit nur je einer OH-Gruppe substituiert sind.

1.6.7 CD-Spektren und absolute Konfiguration von EA-2 und EA-3

Bereits in den NMR-Spektren ergaben sich deutliche Hinweise auf Stereoisomere. Nach Aufklärung der Struktur erhebt sich deshalb die Frage nach der absoluten Konfiguration der Verbindungen EA-2 und EA-3. Die Kurven des Circular dichroismus von EA-2 und EA-3 sind nachstehend beschrieben (Abb. 9).

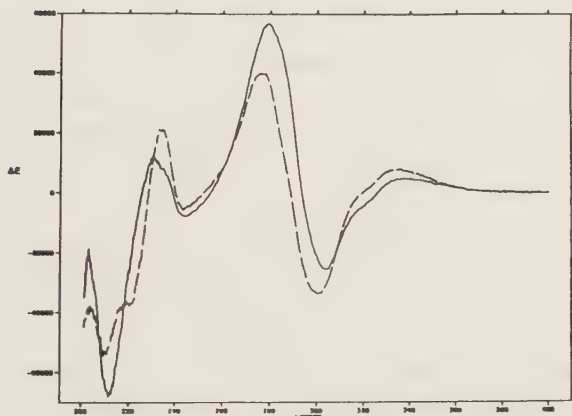


Abb. 9 Aufnahme des Circular dichroismus von EA-2 (—) und EA-3 (---)

Durch Vergleich mit den umfangreichen Untersuchungen von GAFFIELD (1970) ergeben sich aus dem Cotton-Effekt um 290 nm (–) und 330 nm (+) Hinweise dafür, daß die Kohlenstoff I-C 2 und II-C 2 (s. S.28) die in der Strukturformel gezeigte Konfiguration haben (die Wasserstoffe weisen nach oben). Demzufolge erhält man nach der Cahn-Ingold-Prelog-Nomenklatur (1956) für den I-C 2 Kohlenstoff **S-Konfiguration** und für den II-C 2 Kohlenstoff **R-Konfiguration**, obwohl die sterische Anordnung dieser Wasserstoffe gleich ist.

Aufgrund der Kopplungskonstanten von etwa 11 Hz aus den NMR-Messungen (s. Tab. 4, S.24) muß auf *trans*-Stellungen des

Protons am I-C 2 mit dem Proton am I-C 3 bzw. II-C 2 mit II-C 3 geschlossen werden.

Somit ist für den Flavanonteil eine 2S3R-Konfiguration und für den Flavanonolteil eine 2R3R-Konfiguration anzunehmen. Aufgrund des Kurvenverlaufes der CD-Spektren zwischen 280 nm (+) und 305 nm (-) kann auf eine starke excitonische Kopplung der beiden Teilsysteme geschlossen werden. Der S-formige Kurvenverlauf mit Nulldurchgang nahe dem Absorptionsmaximum im UV (293 nm) ist dafür typisch. Dies paßt gut mit dem Vorliegen von Biflavonoiden zusammen, bei denen nach GEIGER & QUINN (1975) **Atropisomerie** bekannt ist; bei EA-3 und EA-2 zwischen I-C 3 und II-A 8. Die unterschiedlichen Lagen der phenolischen OH's bei den NMR-Messungen sind durch diese **Atropisomerie** erklärt.

Durch Messung der Protonenresonanz bei verschiedenen Temperaturen konnte nachgewiesen werden, daß ab 70 °C alle Protonen, die in Tab. 4 mit Doppelpositionen angegeben sind, zusammenfallen. Dieser Befund entspricht voll dem Verhalten, das für Atropisomere zu erwarten ist.

Eine Trennung der Isomeren gelang trotz mehrfacher Versuche mit verschiedenen modernen Trennverfahren nicht; bei Atropisomeren ist dies allerdings auch selten möglich.

Nach Identifizierung der Strukturen von EA-3 und EA-2 zeigte sich, daß beide Verbindungen bereits von COTTERILL und SCHEINMANN (1978) beschrieben worden sind. Vergleichsproben waren nicht erhältlich, aber der Vergleich der publizierten UV-, IR- und Massenspektren belegen die Identität. Die genannten Autoren haben jedoch keine Aussagen zur Stereochemie gegeben.

Die Biflavanonole **EA-3** und **EA-2** stellen mit 65 % und 25 % den Hauptanteil der "wirksamen" EtOAc-Fraktion (vgl. S.10) und zeigen im Test nach KISO et al. (vgl. S.16) auch die größte "Leberaktivität". Für die weiteren Untersuchungen wurden deshalb nur diese beiden Verbindungen verwendet. Bezogen auf das Ausgangsmaterial getrockneter Nüsse beträgt die genannte Ausbeute an EA-3 0.26 % und an EA-2 0.10 %

2. Untersuchungen zum Einfluß der leberaktiven Garcinia-Inhaltsstoffe auf die Protein- und Nucleinsäuresynthese in der Leberzelle

Im vorausgegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, daß die Garcinia-Flavonoide EA-3 und EA-2 die CCl₄- und GalN-induzierten Schädigungen der Leberzellen antagonisieren können. Unklar ist die Wirkung dieser Stoffe auf molekularer Ebene.

Eine denkbare Möglichkeit ist, daß die Garcinia-Biflavonoide im CCl₄- sowie im GalN-Modelle wie das Flavonolignan Silibinin die Regenerationsfähigkeit der geschädigten Leberzellen erhöhen. Vom biochemischen Standpunkt aus wäre in diesem Fall zu erwarten, daß die Verbindungen Stoffwechselvorgänge beeinflussen, welche die Neubildung von Proteinen und eventuell von Ribonucleinsäuren stimulieren. Im Falle von Silibinin, einer bekannten antihepatotoxischen Droge, ist gezeigt worden, daß die beobachtete Steigerung der Leberregeneration nach Schädigung (MAGLIULO et al., 1973) auf einer derartigen Stoffwechselaktivierung beruht (SONNENBICHLER et al., 1976; MACHICAO & SONNENBICHLER, 1977; SONNENBICHLER & ZETL., 1985; SONNENBICHLER et al., 1986).

Um diese Hypothese zu prüfen, interessierte zunächst die Frage, ob die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide die Protein-Synthese beeinflussen. Da alle Versuche in vivo infolge der schwer überschaubaren Resorptionsvorgänge, Tagesrhythmen des Gesamtorganismus und ähnlich wenig kontrollierbarer Einflüsse schwierig auszuwerten sind, wurde der Einfluß von EA-2 bzw. EA-3 auf die Protein-Synthese in vitro zuerst mit aus Ratten isolierten Hepatozyten untersucht. Zeit- und Dosisabhängigkeit der Effekte wurden gemessen.

Die organspezifischen Eigenschaften und Funktionen der

Leberzelle bleiben in Kultur außerhalb des Gewebeverbandes bis zu 10 h nach Isolierung weitgehend erhalten, so daß eine Übertragung der *in vitro* Befunde auf *in vivo* Verhältnisse in begrenztem Rahmen zulässig erscheint (BAUER et al., 1975; BERG et al., 1973; GUGUEN-GUILLONZO et al., 1978 ; DAST et al., 1973; BERRY & KUM, 1972). Vorzüge einer Hepatozytensuspension sind außerdem, daß viele homogene Proben entnommen werden können und die synthetisierten Proteine durch simple Fällungsschritte erhalten werden. Um mit Sicherheit den Einfluß von Alterungsprozessen der Hepatozyten auszuschließen, wurde die Protein-Synthese stets nur bis maximal 8 h nach Präparation untersucht. Als Referenz zum Vergleich mit den Effekten der Garcinia-Inhaltsstoffe wurden gleichzeitig Ansätze mit Silibinin gemessen.

2.1 Untersuchungen zur Beeinflussung der Protein-Synthese durch die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide EA-2 und EA-3

Zur Messung der Protein-Synthese wurde das neusynthetisierte Protein durch Zugabe von radioaktivem Methionin bzw. Leucin markiert. Der Einbau der radioaktiven Vorläufermoleküle in der Zeiteinheit gibt ein Maß für Umfang und Geschwindigkeit der Protein-Synthese. Die Abtrennung des in Eiweiß eingebauten radioaktiven Precursors von den freien Aminosäuren erfolgte durch Fällung der Makromoleküle mit TCA, Elimination der radioaktiv markierten an t-RNA gebundenen Aminosäuren durch Hydrolyse und Herauswaschen der freien radioaktiven Aminosäuren. Als radioaktiver Baustein wurde ^{35}S -Methionin bzw. ^3H -Leucin gewählt, zwei in Protein häufig auftretende Aminosäuren, die in Leberzellen nicht synthetisiert werden.

Die vollständige Hemmung der Protein-Synthese gibt eine Kontrolle über den Background des Untersuchungssystems. Als

eine der Kontrollen und zur Blockade der in-vitro-Proteinsynthese wurden deshalb auch Versuche mit Cycloheximid durchgeführt, das seit langem als Inhibitor der Protein-Synthese bekannt ist (SISLER & SIEGEL, 1967; CLARK & ALBERT, 1965; ENNIS & LUBIN, 1964). Die Wirkung dieser Verbindung beruht auf einer Hemmung der Übertragung der aktivierten Aminosäuren von Aminoacyl-t-RNA auf neusynthetisiertes Protein (CLARK & CHANG, 1965).

2.1.1 Zeitverlauf der Protein-Synthese unter dem Einfluß von EA-2 bzw. EA-3

Um festzustellen, ob die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide die Proteinbiosynthese beeinflussen, wurden suspendierte Hepatozyten nach Präparation aus männlichen Ratten mit ^{35}S -Methionin in Gegenwart niedriger Konzentrationen ($9\text{ }\mu\text{M}$) EA-2 bzw. EA-3 inkubiert. Die Proteinsyntheserate wurde zu verschiedenen Zeiten durch Messung der nicht hydrolysierbaren Radioaktivität in den TCA-Präzipitaten der hochmolekularen Zellbestandteile aus den gewaschenen Zellen bestimmt. Versuche mit Silibinin ($9\text{ }\mu\text{M}$) und Cycloheximid ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) dienten als Referenzexperimente (Abb. 10, S.37).

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, steigert in diesem Versuchsansatz EA-3 die ^{35}S -Methionineinbauraten in neusynthetisierte Proteine nach 4 h um ca 25 %, EA-2 und Silibinin um ca 18 %. Wiederholungen des Experiments mit ^{14}C -Leucin als Vorstufe und auch mit Hepatozyten aus weiblichen Ratten ergaben stets einen ähnlichen Kurvenverlauf. Somit ist die Reproduzierbarkeit gegeben und es scheint keine geschlechtsspezifische Beeinflussbarkeit vorzuliegen.

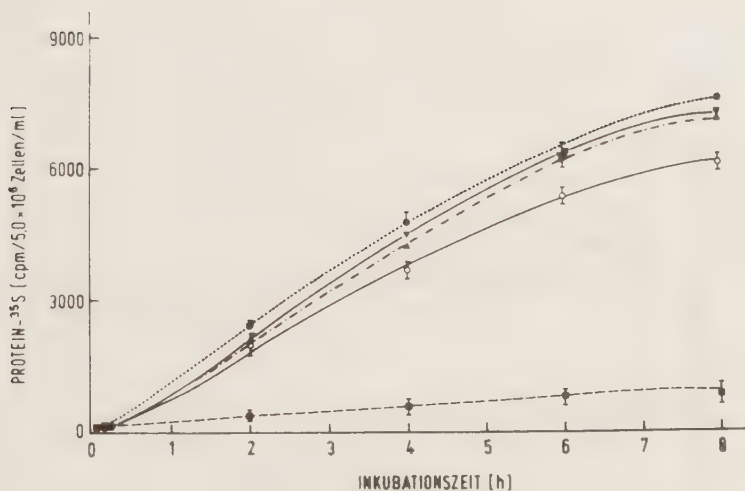


Abb. 10 Zeitabhängiger ^{35}S -Methionineinbau ($2\ \mu\text{Ci/ml}$) in neusynthetisiertes Protein in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^6 Zellen/ml) ohne (o) und unter dem Einfluß von jeweils $9\ \mu\text{M}$ EA-2 (Δ), EA-3 ($\bullet$), Silibinin ($\blacktriangledown$) und $10\ \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid ($\blacksquare$)

2.1.2 Konzentrationsabhängigkeit der Beeinflussung der Protein-Synthese durch EA-3 bzw. EA-2

Wie oben gezeigt, stimulieren die "aktiven Garcinia-Flavonoide" EA-3 und EA-2 die Protein-Syntheserate in Ratten-Hepatozyten in einer Konzentration von $9\ \mu\text{M}$. Die Frage nach der Konzentrationsabhängigkeit des Effektes war zu klären. Suspensierte Hepatozyten wurden deshalb mit verschiedenen Mengen der Teststoffe versetzt und dann die Syntheserate mit ^{35}S -Methionin verfolgt. Der Einbau von ^{35}S -Methionin wurde jeweils 4 h nach Zugabe der markierten Aminosäure gestoppt (HAUSCHKA, 1973). Silibinin diente in vergleichbaren Konzentrationen als Referenzsubstanz (Abb. 11).

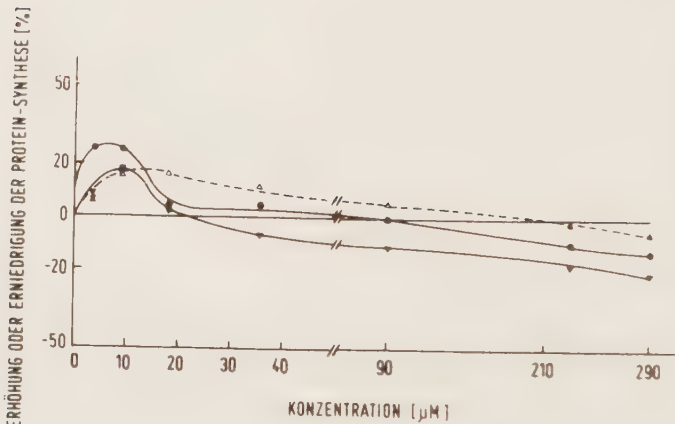


Abb. 11 Prozentualer Einbau von ^{35}S -Methionin in Proteine aus Hepatozyten und Konzentrationsabhängigkeit der durch EA-2- (Δ), EA-3- ($\bullet$) und Silibinin- ($\blacktriangledown$) beeinflussten Protein-Syntheserate in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^4 Zellen/ml) nach 4 h Inkubation

Wie aus Abb. 11 ersichtlich ist, zeigen die mit Garcinia-Flavonoiden bzw. Silibinin inkubierten Zellen eine deutliche Steigerung des ^{35}S -Methionineinbaus in neusynthetisierte Proteine in niedrigen Konzentrationsbereichen. Die optimal stimulierende Dosis für EA-3 liegt bei 4- bis $9 \mu\text{M}$, die für Silibinin bei ca $10 \mu\text{M}$ und die für EA-2 bei 9- bis $17 \mu\text{M}$. Ab $90 \mu\text{M}$ EA-3 oder $210 \mu\text{M}$ EA-2 oder $23 \mu\text{M}$ Silibinin scheinen Hemmeffekte auf den Precursoreinbau in Proteine aufzutreten. Experimente mit ^{14}C -Leucin als Vorstufe ergaben ein ähnliches Bild. Sowohl mit ^{35}S -Methionin wie auch mit ^{14}C -Leucin als Vorstufe blieben die optimal stimulierenden Konzentrationen gleich. Allerdings wird in Gegenwart hoher Konzentrationen der Testsubstanzen der Leucineinbau in

Protein starker reduziert als mit Methionin. Offensichtlich sind die Transportsysteme für diese Aminosäuren in Anwesenheit hohen Flavonoidkonzentration unterschiedlich betroffen. Der Befund, daß EA-3 in diesem Test etwas starker wirkt als EA-2 und Silibinin, wird in Teil III.2.1.4 (S.42) diskutiert werden. Dieser verminderte Einbau der radioaktiven Vorläufer unter dem Einfluß größerer Konzentrationen der untersuchten Flavonoide ist ein molekularbiologisch nicht leicht zu erklärendes Phänomen, wenn man nur **einen** Wirkungsmechanismus und **einen** Wirkort annimmt.

2.1.3 Zeitverlauf der Protein-Synthese unter dem Einfluß von hohen Konzentrationen EA-2 bzw. EA-3

Um sicherzustellen, daß unter der Wirkung der hohen Konzentrationen der leberaktiven Garcinia-Inhaltsstoffe ein zeitlich ähnlicher Verlauf der Protein-Synthese erhalten bleibt wie in Abb. 10 und daß die 4 h Werten der Abb. 11 wirklich eine Verminderung des Precursoreinbaus in Protein widerspiegeln und nicht etwa nur eine zeitliche Verschiebung eines Stimulierungseffektes beobachtet wird, wurde der Zeitverlauf des ^{35}S -Methionineinbaus in isolierte Hepatozyten unter dem Einfluß der relativ hohen Konzentrationen (900 μM) Garcinia-Flavonoide untersucht. Silibinin diente wieder in denselben Konzentrationen als Referenzsubstanz (Abb. 12).

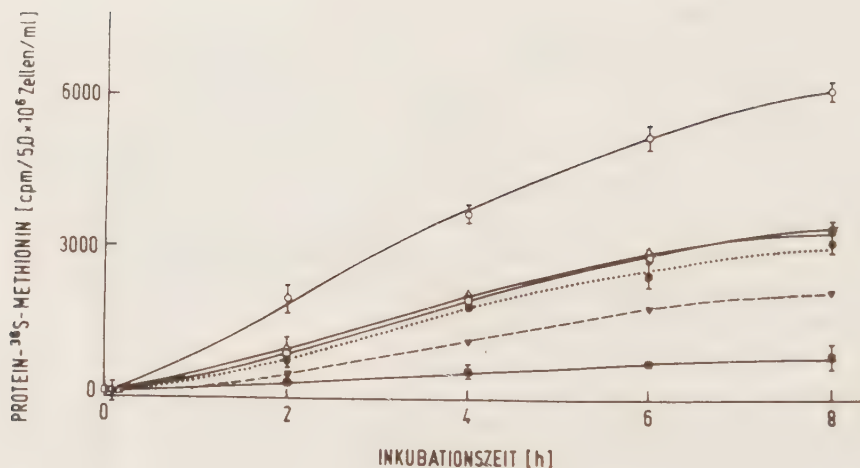


Abb. 12 Zeitverlauf des ^{35}S -Methionineinbaus in Hepatozyten ohne (o) und mit Einfluß von jeweils $900\mu\text{M}$ EA-2 (Δ), EA-3 ($\bullet$), Silibinin ($\blacktriangledown$), $577\mu\text{M}$ Silibinin ($\square$) und $10\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid ($\blacksquare$)

Wie man aus Abb. 12 entnehmen kann, bleibt auch bei hohen Konzentrationen ein sigmoider Verlauf des Precursoreinbaus in Proteine unter dem Einfluß der Garcinia-Flavonoide bzw. Silibinin erhalten. Der Kurvenverlauf zeigt keine Zeitverschiebung im Vergleich zu Abb. 10. Bei 4 h Inkubationszeit wird der Einbau des radioaktiven Vorlaufers gegenüber der Kontrolle durch EA-2 um 47 %, durch EA-3 um 54 % vermindert. Silibinin hemmte nach 4 h den Einbau um 70 %. Mit in die Abbildung aufgenommen ist die Kurve für $577\mu\text{M}$ Silibinin, die in Abb. 13 zum Vergleich benötigt wird und beim 4 Stundenwert eine "Einbauhemmung" gegenüber der Kontrolle von 46 % aufzeigt.

Werden die Zellen jedoch mit $900\mu\text{M}$ EA-3 bzw. $577\mu\text{M}$ Silibinin 1 h vorinkubiert, dann tritt ein neuer Effekt auf (Abb. 13).

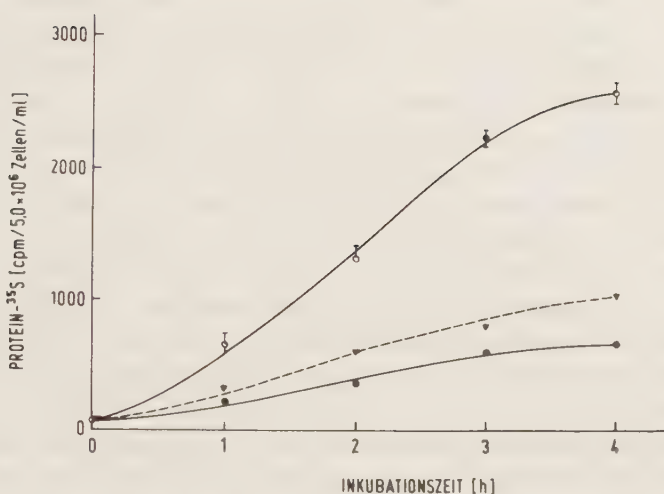


Abb. 13 Zeitabhängigkeit des ^{35}S -Methionineinbaus in neusynthetisierte Proteine in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^6 Zellen/ml) ohne (O) und mit $900\mu\text{M}$ EA-3 (●) oder $577\mu\text{M}$ Silibinin (▼), die 1 h vorher den Hepatozyten zugesetzt wurden

Wie Abb. 13 zeigt, wird nach 1-stündiger Vorinkubation der Precursoreinbau in neusynthetisiertes Protein durch EA-3 um 74 % und durch Silibinin um 62 % vermindert. Die Hemmwirkung der Flavonoide auf den Precursoreinbau in neusynthetisierte Proteine wird durch die Vorinkubation der Zellen deutlich verstärkt, d.h. für EA-3 von 54 % auf 74 % und für Silibinin von 46 % auf 62 %.

2.1.4 Diskussion der Ergebnisse zur Beeinflussung der Protein-Synthese in vitro durch die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide

Die pharmakologischen Teste hatten auf antihepatotoxische Eigenschaften der Garcinia-Flavonoide EA-2 und EA-3 hingewiesen und als eine der möglichen Erklärungen eine durch diese Flavonoide bedingte schnellere Regeneration der Leberzellen vermuten lassen. Grundlage eines erhöhten Regenerationsvorgangs ist eine Stoffwechselaktivierung und auch eine beschleunigte Protein-Synthese. Es erschien deshalb interessant, den Einfluß von EA-2 bzw. EA-3 auf die Protein-Syntheserate in isolierten Hepatozyten zu untersuchen.

Wegen der schwer überschaubaren, komplexen Prozesse im Gesamtorganismus bei Applikation einer Droge, wurde die Protein-Synthese in isolierten Ratten-Hepatozyten in Kultur untersucht. Um den Einfluß von Alterungsprozessen und Entdifferenzierung der Hepatozyten auszuschließen, wurde der Prozeß bis zu höchstens 8 h nach Präparation der Leberzellen verfolgt. Zur Messung der Protein-Synthese wurde ^{35}S -Methionin bzw. ^{14}C -Leucin als spezifischer Baustein der Proteine eingesetzt. Die Menge der in der Zeiteinheit in Proteine eingebauten radioaktiven Aminosäuren stellt ein Maß für die Protein-Syntheserate dar.

Es zeigte sich, daß die Einbaurate von ^{35}S -Methionin in neusynthetisierte Proteine in Hepatozyten aus sowohl männlichen wie weiblichen Ratten unter dem Einfluß kleiner Dosen der aktiven Garcinia-Inhaltsstoffe (wie auch durch Silibinin) um 20 - 25 % gesteigert wird (Abb. 10).

Die im Vergleich zu in vivo Experimenten mit Silibinin relativ geringe Steigerung der Einbaurate kann durch Abgabe von neusynthetisierten Proteinen an das Medium (WIEGAND et al., 1971) erklärt werden. Der Anteil der ins Medium sezernierten Proteine wurde bei der Analyse der Synthese in Hepatozyten nicht mitgemessen. Die Fällung dieser Proteine

aus dem Medium, wo noch viel unverbrauchter, radioaktiv markierter Vorläufer vorliegt, wurde versucht, führte aber offensichtlich wegen unspezifischer Adsorption der freien radioaktiven Aminosäuren an die hochmolekularen Bestandteile des Mediums zu keinen brauchbaren Ergebnissen.

Als stimulierend erwiesen sich Konzentrationen von 2-50 μM EA-3, 2-190 μM EA-2 und 2-18 μM Silibinin in suspendierten Hepatozyten (Abb. 11). Bemerkenswert ist, daß bereits 4 μM EA-3 die Protein-Syntheserate ca 3 x so stark wie 4 μM EA-2 oder Silibinin steigert. Im optimum (EA-3 4-9 μM , EA-2 9-17 μM und Silibinin ca 10 μM) wird allerdings die Syntheserate durch EA-3 ca 1.4 x so stark wie EA-2 oder Silibinin stimuliert. Eine der eigentlichen stimulierenden Interaktion vorausgehende Metabolisierung konnte der Grund dafür sein. Für Silibinin ist gezeigt worden, daß es in seiner unveränderten Struktur an die DNA-abhängige RNA-Polymerase I bindet und über die Ribosomensynthese Einfluß auf die Proteinsynthese ausübt. In Fall der Biflavonoide EA-3 und EA-2 fehlen aber derartige Hinweise vorläufig. Eine Spaltung in der Zelle in jeweils zwei Flavonoidmoleküle als eigentliche Wirkformen wird später nachgewiesen.

Hemmend erwiesen sich Konzentrationen ab 90 μM EA-3, 210 μM EA-2 und 23 μM Silibinin. Der sigmoide Verlauf der Synthesen bleibt erhalten und zeigt auch keine zeitlichen Verschiebungen (Abb. 12), so daß auf eine echte Verminderung des Precursoreinbaus in Proteine durch die Teststoffe zu schließen ist. Es ist unwahrscheinlich, daß ein und dieselbe Substanz an einem Wirkort konzentrationsabhängig stimulieren und hemmen kann. Wirkt eine Substanz beispielsweise als Effektor an einer Regulationseinheit, so wird die gleiche Regulatorstelle durch höhere Konzentrationen kaum inaktiviert werden. Viel eher ist im Falle des hier geschilderten konzentrationsabhängigen Übergangs einer Stimulierung in eine Hemmwirkung die Annahme wahrscheinlich,

daß sich zwei (oder mehr) Interaktionsarten der Flavonoide mit Zellkomponenten überlagern und das beobachtete Phänomen hervorrufen. In Abschn. 3 wird gezeigt werden, daß die Flavonoide in höheren Konzentrationen die Permeabilität der Membranen beeinflussen, wobei die Hemmung spezifischer Transportsysteme unterschiedlich auftritt. Damit wird auch der Befund erklärlich, daß eine Vorinkubation der Hepatozyten mit EA-3 bzw. Silibinin zu einer deutlich stärkeren Reduktion der Einbauraten führt als ohne Vorbehandlung. In der Tat wird die Proteinsynthese bei höheren Flavonoidkonzentrationen nicht gehemmt, lediglich die Aufnahme der radioaktiven Precursor in die Zelle ist blockiert und läßt die Synthesegeschwindigkeit kleiner erscheinen.

Umgekehrt konnte eine scheinbar höhere Einbaurate radioaktiver Aminosäuren bei den niedrigen Flavonoidkonzentrationen so zustande kommen, daß durch eine positive Veränderung der Membranpermeabilität für Proteinbausteine deren Einstrom beeinflußt wird und je mehr intrazelluläre radioaktive Bausteine zur Verfügung stehen, desto mehr wird in neusynthetisierte Proteine eingebaut werden. Wie ebenfalls später gezeigt werden wird, steigern kleine Garcinia-Flavonoid- bzw. Silibininkonzentration die Proteinbausteinaufnahme in Hepatozyten nicht (Tab. 7). Damit ist anzunehmen, daß die Stimulierung der Protein-Synthese durch kleine Konzentration EA-3 bzw. EA-2 über eine Beeinflussung eines Regulationsvorgangs in der Zelle zustande kommt.

Die gesteigerte Proteinbiosynthese in den Hepatozyten ist eine Voraussetzung für den Ersatz zerstörter Zellproteine (MAGLIULO et al., 1973, 1979). Es ist vorstellbar, daß durch erhöhte Eiweißsynthese in der Leber Regenerationsvorgänge beschleunigt und Leberschaden wirksamer eliminiert werden. Dies könnte die in Teil III.1.3 und 1.5 beschriebene "Schutzwirkung" der Garcinia-Flavonoide bzw. des Silibinins auf Hepatozyten gegen CCl₄- und GalN-Schädigung erklären.

2.2 Experimente zum Einfluß der antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide auf die RNA-Synthese in isolierten Ratten-Hepatozyten

Die der Protein-Synthese vorausgehende biochemische Reaktion ist die RNA-Synthese. Da die Proteine in Gegenwart der Garcinia-Flavonoide EA-3 und EA-2 eine erhöhte Biosyntheserate zeigen, war die Frage naheliegend, ob die beobachtete Stimulierung wie im Fall des Silibinins (SONNEBICHLER & ZETL, 1986) die Folge eines Anstiegs der RNA-Synthese ist. In folgenden Versuchsreihen wurde deshalb der Einfluß von EA-3 bzw. EA-2 auf die RNA-Synthese in isolierten Ratten-Hepatozyten gemessen. Dazu wurden unterschiedliche Mengen der Biflavonoide dem Synthese-System zugesetzt und der Zeitverlauf des Uridineinbaus verfolgt.

Die unmittelbaren Vorläufer der neugebildeten RNA sind u.a. Uridinphosphate. Da Nucleosidphosphate die Zellmembran wegen ihres speziellen Transportsystems nicht passieren können (MURAMATSU et al., 1964), verwendet man einfache Nucleoside oder Vorstufen davon, wie z.B. Uridin (BRESNICK, 1971). Die Spezifität des hier verwendeten ($5\text{-}^3\text{H}$)-Uridins zur RNA-Kennzeichnung ist zweifach gesichert: Es wird nicht in DNA eingebaut; auch wenn es zu Thymidin, einem DNA-Baustein, methyliert wurde, schließt die radioaktive Markierung mit ^3H in 5-Stellung einen Fehler aus, da bei Methylierung an dieser Stelle die Radioaktivität verloren ginge (HAYOE & QUAGLINO, 1965).

Zur Überprüfung des Versuchssystems wurden auch Experimente mit Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin D durchgeführt. Actinomycin D ist seit langem als Inhibitor der enzymatischen DNA-abhängigen RNA-Synthese bekannt (HARTMANN et al, 1962; REICH & GOLDBERG, 1964). Die Wirkung dieser Verbindung beruht auf einer Interkalation des Molekuls in die DNA, wobei bevorzugt die GC reichen

DNA-Sequenzen betroffen werden. Mit $0.05 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D wird spezifisch die ribosomale RNA-Synthese gehemmt (DARNELL et al., 1971); in höherer Konzentration ($5 \mu\text{g/ml}$) hemmt Actinomycin D in Zellkulturen die gesamte RNA-Synthese.

2.2.1 Zeitverlauf der RNA-Synthese unter dem Einfluß von EA-2 bzw. EA-3

Zur Messung der RNA-Synthese in Abhängigkeit von der Zeit wurden die Hepatozyten im Medium in Gegenwart von $9 \mu\text{M}$ EA-2 bzw. EA-3 und mit $2 \mu\text{Ci/ml}$ radioaktiv markiertem Uridin als Marker inkubiert. Die Synthese wurde durch TCA-Fällung der hochmolekularen Zellbestandteile zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und die eingebaute Radioaktivität bestimmt. Silibinin diente wieder als Referenzsubstanz (Abb. 14).

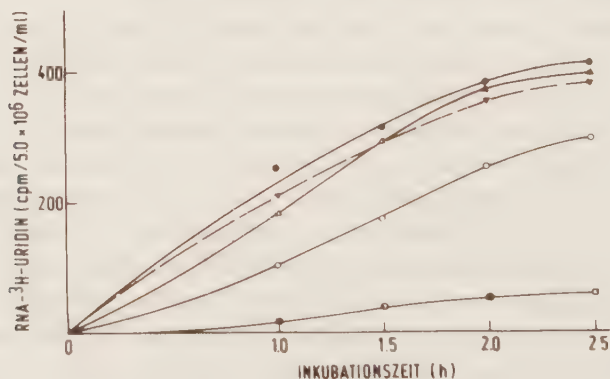


Abb. 14 Zeitabhängiger Einbau von ^3H -Uridin ($2 \mu\text{Ci/ml}$) in neusynthetisierte RNA in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^6 Zellen/ml) ohne (o), unter dem Einfluß von jeweils $9 \mu\text{M}$ EA-3 (●), EA-2 (△) und Silibinin (▼) in Gegenwart von $6 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D (□)

Im Vergleich zu den Kontrollen ist der Einbau von ^3H -Uridin in neusynthetisierte RNA in Gegenwart von $9\ \mu\text{M}$ EA-3 bzw. EA-2 nach 2 h um ca 50 % stets reproduzierbar gesteigert. Silibinin stimuliert die Syntheserate in ähnlicher Größenordnung.

2.2.2 Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von EA-2 bzw. EA-3 auf die RNA-Synthese

Die RNA-Synthese in Hepatozyten in Gegenwart der anti-hepatotoxischen Garcinia-Flavonoide zeigt nach 2 h eine deutlich erhöhte Einbaurrate von radioaktivem Uridin. Da bei der Proteinsynthese in höheren Konzentrationen Hemmeffekte beobachtet worden waren, war abzuklären, ob dieses Phänomen auch im Fall der RNA-Synthese auftritt. Deshalb wurde die RNA-Syntheserate in Ratten-Hepatozyten in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von EA-2 bzw. EA-3 gemessen (Abb. 15).

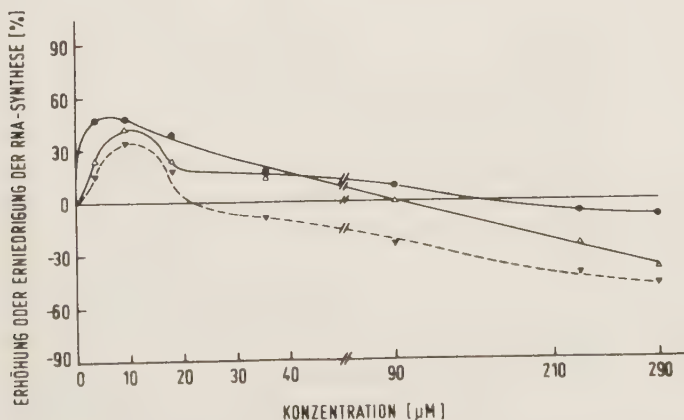


Abb. 15 Beeinflussung der RNA-Synthese in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^6 Zellen/ml) unter dem Einfluß steigender Konzentration von EA-3 (●), EA-2 (Δ) und Silibinin (▼) nach 2 h Inkubation

Wie aus Abb. 15 ersichtlich wird, liegt die optimale Wirkkonzentration für EA-3 bei 4-9 μM , die für EA-2 und Silibinin bei ca 10 μM . Im Optimum steigert EA-3 die Syntheserate ca 1.3 x so stark wie EA-2 oder Silibinin. Ab 168 μM EA-2 und 90 μM EA-3 wird der Precursoreinbau in RNA gehemmt. Ab 22 μM scheint auch Silibinin die RNA-Synthese zu hemmen.

2.2.3 Zeitverlauf der RNA-Synthese unter dem Einfluß hoher Konzentrationen EA-2 bzw. EA-3

Um zu prüfen, ob unter der Wirkung der Garcinia-Flavonoide ein zeitlich ähnlicher Verlauf der RNA-Synthese erhalten bleibt und bei den 2 h Werten der Abb. 15 wirklich eine Verminderung des Precursoreinbaus in RNA vorliegt und nicht nur eine zeitliche Verschiebung beobachtet wird, wurde auch der Zeitverlauf der RNA-Synthese unter dem Einfluß sehr hoher Konzentration (900 μM) EA-2 bzw. EA-3 verfolgt.

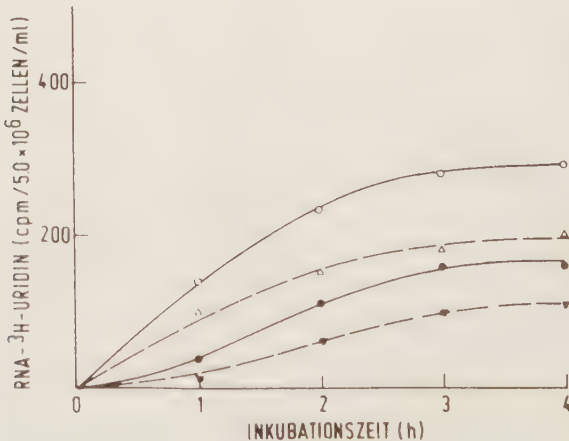


Abb. 16 Zeitverlauf der RNA-Synthese in Hepatozyten ohne (o) und unter dem Einfluß von jeweils 900 μM EA-2 (Δ), EA-3 ($\bullet$), und Silibinin ($\blacktriangledown$)

Die Syntheseraten wurden wie bei den vorausgegangenen Versuchen gemessen. Silibinin diente wieder als Referenzsubstanz. Wie Abb. 16 (S.48) zeigt, hemmt nach 2 h Inkubationszeit EA-2 den ^3H -Uridineinbau in RNA um ca 39 %, EA-3 um ca 54 % und Silibinin um ca 76 %.

Werden die Zellen mit den Verbindungen (900 μM) 1 h vorinkubiert, dann wird der Hemmeffekt auf den ^3H -Uridineinbau in RNA wesentlich verstärkt. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für den ^{35}S -Methionineinbau in Protein beschrieben (S.41).

2.3 Untersuchung zur Beeinflussung der RNA-Synthese in isolierten Zellkernen durch die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide

Wie gezeigt werden konnte, wird in isolierten Hepatozyten die RNA-Synthese durch niedrige Konzentrationen von EA-2 bzw. EA-3 stimuliert. In Analogie zu Untersuchungen mit Silibinin (MACHICAO & SONNENBICHLER, 1977; SONNENBICHLER & POHL, 1980) war zu fragen, ob die Biflavonoide auch in isolierten Zellkernen die RNA-Synthese stimulieren können. Hierzu wurden Zellkerne präpariert und durch Zugabe von ^3H -UTP die RNA-Synthese gemessen. Die zu untersuchenden Testsubstanzen wurden in der bei Silibinin (MACHICAO & SONNENBICHLER, 1977) festgestellten optimalen Wirkdosis (0.1 μM) dem Synthesesystem zugesetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurde in den Kernen der Einbau von ^3H -UTP in TCA-präzipitierbares Material gemessen. Silibinin diente wieder als Referenzsubstanz.

Um die "Vitalität" des Testsystems zu prüfen, und um die Aktivität der DNA-abhängigen RNA Polymerasen im Kern zu differenzieren (STIRPE & FIUME, 1967), wurde auch unter Zusatz von α -Amanitin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gearbeitet.

In Abb. 17 ist der zeitliche Verlauf des Einflusses der

untersuchten Flavonoide EA-3 und Silibinin auf die RNA-Synthese in Zellkernen dargestellt.

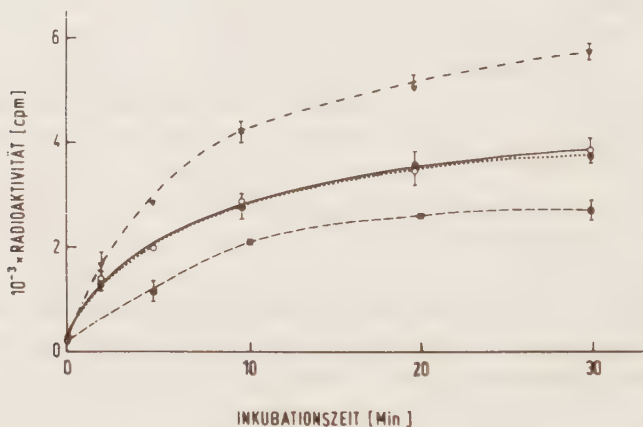


Abb. 17 Zeitabhängigkeit des Einbaus von Radioaktivität in die RNA von Rattenleberkernen ($1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-UTP}$ auf 1×10^6 Rattenleberkerne in 0.1 ml) ohne (○) und in Gegenwart von jeweils $0.1 \mu\text{M}$ Silibinin (▼) und EA-3 (●) und $2 \mu\text{g } \alpha\text{-Amanitin/ml}$ (■)

Aus Abb. 17 läßt sich entnehmen, daß -wie bekannt- die Einbaurrate von $^3\text{H-UTP}$ in Kern-RNA durch Silibinin erhöht wird. Erstaunlicherweise zeigt EA-3 hier keinen Effekt. Wiederholungen des Experiments - auch mit verschiedenen EA-3-Konzentrationen ($0.2\text{-}10 \mu\text{M}$) - lieferten kein anderes Ergebnis. Mit EA-2 wurden auch ähnliche Ergebnisse erhalten. Weder bei niedrigen, noch bei hohen Dosen scheinen die Garcinia-Flavonoide im Kernsystem ihre synthesesestimulierenden Eigenschaften wie bei Hepatozyten zu haben.

2.4 Diskussion zur Beeinflussung der Protein- und RNA-Synthese durch die antihepatotoxischen Garcinia-Biflavonoide EA-3 und EA-2

In den beschriebenen Untersuchungen (Abschn. 2.1) konnte eine Stimulierung der Protein-Synthese in Hepatozyten durch die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide EA-3 und EA-2 gezeigt werden. Zur Messung der Protein-Synthese wurde ^{35}S -Methionin bzw. ^{14}C -Leucin verwendet. Der Protein-Synthese ist als vorausgehende biochemische Reaktion die RNA-Synthese vorgeschaltet. Die RNA-Synthese wurde ebenfalls in isolierten Ratten-Hepatozyten untersucht. Um mit Sicherheit den Einfluß von Alterungsprozessen isolierter Hepatozyten in Kultur auszuschließen, wurden die RNA-Synthesen nur bis zu 4 h verfolgt. Zur Messung der RNA-Synthese wurde radioaktives Uridin als spezifischer Bestandteil der RNA eingesetzt.

Wie gezeigt werden konnte, wird auch die RNA-Synthese in Hepatozyten unter dem Einfluß kleiner Konzentrationen ($9\text{ }\mu\text{M}$) der Garcinia-Flavonoide stimuliert. Als synthesessteigernd in Hepatozytenkulturen zeigten sich Konzentrationen von $2\text{--}89\text{ }\mu\text{M}$ EA-3, $2\text{--}140\text{ }\mu\text{M}$ EA-2 (zum Vergleich: $2\text{--}20\text{ }\mu\text{M}$ Silibinin). Die optimal stimulierenden Konzentrationen liegen für EA-3 bei $4\text{--}9\text{ }\mu\text{M}$, für EA-2 bei $9\text{ }\mu\text{M}$ und für Silibinin bei $10\text{ }\mu\text{M}$. Bemerkenswert ist, daß $4\text{ }\mu\text{M}$ EA-3 die RNA-Synthese in Ratten-Hepatozyten etwa doppelt so stark wie EA-2 oder Silibinin stimuliert.

Augenscheinlich verhält es sich so, daß als Folge einer Transkriptionsbeschleunigung sekundär auch die Protein-Synthese stimuliert wird. Das Ausmaß der Stimulierung der RNA-Synthese in Ratten-Hepatozyten durch EA-2 bzw. EA-3 ist aber deutlich höher als der in Abschn. 2.1 beschriebene Anstieg der Protein-Synthese. Eine mögliche Erklärung wäre, daß zwischengeschaltete Regulationsschritte dampfend wirken

und den Primareffekt nicht "durchschlagen" lassen. Als Folge der Meßtechnik ist aber auch anzunehmen, daß nur ein Teil der Protein-Synthese gemessen wurde : der Anteil der ins Medium sezernierten Eiweißkörper konnte aus technischen Gründen wie auf S.42 beschrieben nicht erfaßt werden.

Als Erklärung für die Stimulierung der RNA-Synthese in isolierten Ratten-Hepatozyten durch die Garcinia-Flavonoide kann eine Reihe von Hypothesen diskutiert werden. Beginnend mit der möglichen Beschleunigung energieliefernder Prozesse der Zelle bis zur direkten Stimulierung des Transkriptionsmechanismus oder der Möglichkeit einer spezifischen Genaktivierung kann eine Fülle von Ursachen maßgebend sein. Bemerkenswert ist, daß die pharmakologischen Tests, sowie die Effekte der Garcinia-Flavonoide auf die Protein- und RNA-Synthese eine Ähnlichkeit in der Wirkung von Silibinin zeigen.

Zum Wirkungsmechanismus von Silibinin ist relativ viel bekannt. Unter dem Einfluß von Silibinin zeigt sich bei Ratten in vivo und bei isolierten Hepatozyten in vitro auch ein Anstieg des Einbaus von radioaktiven Precursoren in die neusynthetisierte RNA von Leberzellen (SONNENBICHLER et al., 1976). Umfangreiche Untersuchungen klärten die Frage, wie dieser Effekt zustande kommt: In vitro mit isolierten Zellkernen und Nukleolen konnte von MACHICAO und SONNENBICHLER (1977) nachgewiesen werden, daß nur die ribosomale RNA schneller transkribiert wird. Durch quantitative Analyse der in vivo gebildeten RNA-Spezies unter dem Einfluß von Silibinin konnten SONNENBICHLER und ZETL (1984) feststellen, daß zwar die 28S, 18S und 5.8S ribosomalen RNAs vermehrt synthetisiert und in der Folge beschleunigt in die Ribosomen eingebaut werden, die Synthese von m-RNAs, t-RNAs sowie 5S-RNA aber durch Silibinin nicht nachweisbar beeinflusst wird. Schließlich konnte nach Isolierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen gezeigt werden, daß Silibinin die Transkription durch die RNA-Polymerase I stimuliert. In weiteren Experimenten (SONNENBICHLER et al., 1986) wurde

schließlich gezeigt, daß im Anschluß an die Stimulierung der RNA- und Proteinbiosynthese auch die DNA-Synthese (indirekt) in teilhepatektomierten Rattenlebern durch Silibinin um ca 25 % erhöht wird. Silibinin bindet wahrscheinlich (SONNENBICHLER u. JUNGBLUT, 1986) an eine Untereinheit der RNA-Polymerase I und bewirkt dadurch die beschriebenen Effekte auf die rRNA-, Ribosomen- und Protein-Synthese, sowie auf die Proliferation der Leberzellen.

Eine wesentliche Feststellung im Vergleich von Silibinin mit den Garcinia-Flavonoiden ist der Befund, daß EA-3 und EA-2 in den Experimenten mit gereinigten Zellkernen ihre in Hepatozyten meßbaren synthesesstimulierenden Effekte auf die RNA-Synthese nicht mehr zeigen. Wir vermuten, daß erst ein Metabolit der Garcinia-Flavonoide in der Lage ist, den Einfluß auf die Makromolekul-Synthese in Leberzellen auszuüben, nicht aber das unveränderte Garcinia-Flavonoid. Eine Spaltung der Substanz in einen "aktive Metaboliten" könnte durch cytoplasmatische Enzyme erfolgen. Im Vergleich zu Hepatozyten wäre aber im isolierten Zellkern eine Metabolisierung nicht mehr zu erwarten. Der beobachtete Verlust biologischer Aktivität könnte so erklärt werden.

Für diese These spricht ein Befund, der aus dem nachstehend beschriebenen Experiment hervorgeht. Weiterhin wird am Ende dieses Abschnitts gezeigt werden, daß das Garcinia-Flavonoid EA-3 tatsächlich im Cytoplasma von Leberzellen in einen Metaboliten gespalten wird, der bereits früher (SONNENBICHLER & POHL, 1980) als eine Verbindung erkannt wurde, welche die für die Wirkung von Silibinin wesentlichen Strukturmerkmale aufzeigt.

2.5 Untersuchungen zur Bindung von ^3H -Estradiol an den Estradiolrezeptor aus Schweineuterus in Gegenwart von Silibinin und EA-3

Von SONNENBICHLER und POHL (1980) waren über 40 Flavonoide in in vivo und in vitro Transkriptionssystemen getestet worden, um jene Strukturmerkmale des Silibinins herauszufinden, die für die biologische Wirkung im Transkriptionsprozeß wesentlich sind und die für die Bindung an den "biologischen Wirkort" notwendig erscheinen. Durch Vergleiche der aktiven Substanzen anhand von Kalottenmodellen und in Computersimulationen wurden Strukturähnlichkeiten mit Steroiden vermutet und es entstand die Hypothese, daß die Wirkung des Silibinins auf die rRNA-Synthese durch eine Bindung an einem für ein Steroid spezifischen Rezeptor an der Polymerase I infolge einer Verwechselung der Molekülstruktur zustandekommen konnte. SONNENBICHLER u. JUNGBLUT (1986) haben diese These nun durch ein Experiment wahrscheinlich gemacht.

In einem Bindungsassay wird die Affinität von ^3H -Estradiol und unmarkiertem Estradiol zum Estradiolrezeptor in Konkurrenz zu Substanzen untersucht, die ebenfalls Bindungsaffinitäten zum Rezeptor haben konnten. Die Menge des gebundenen ^3H -Estradiols gibt in diesem Experiment ein Maß für die Konkurrenz der zu testenden Substanz. Je niedriger die gemessene gebundene Radioaktivität, desto höher der Anteil der am Estradiolrezeptor gebundenen Testsubstanz, d.h. desto höher ihre Affinität zum Rezeptor.

Es wurde getestet, ob das intakte EA-3 wie Silibinin die Bindung kompetitiv beeinflussen kann (Abb. 18).

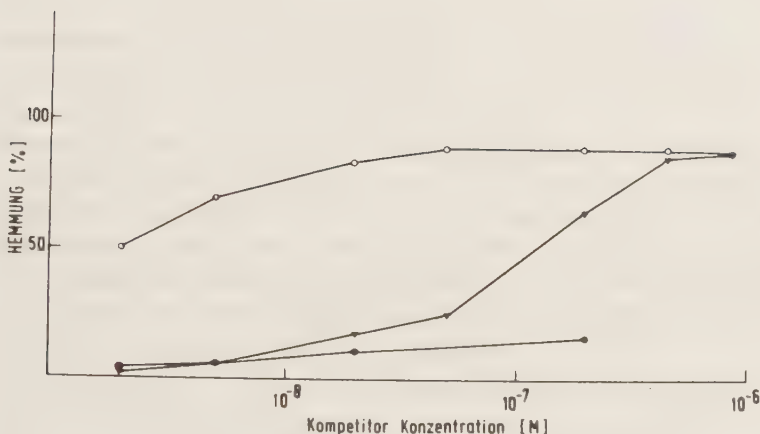


Abb. 18 Konzentrationsabhängigkeit der durch Estradiol- (O) und EA-3- (●) oder Silibinin- (▼) beeinflussten Bindung von ^3H -Estradiol an den Rezeptor aus Schweineuterus nach 17 h Inkubation

Die Kurven in Abb. 18 zeigen, daß Silibinin die Bindung von ^3H -Estradiol an den Estradiolrezeptor bereits in einer Konzentration von $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ und erst recht in steigender Konzentration kompetitiv inhibiert. Dagegen ist keine Beeinflussung der Bindung durch EA-3 beobachtbar. Offenkundig sind Struktur und Molekuldimension von EA-3 ungeeignet, um die Bindung von Estradiol an den Estradiolrezeptor zu kompetitieren.

Dieses Ergebnis unterstützt den Verdacht (S.53), daß EA-2- bzw. EA-3-Metaboliten und nicht die Garcinia-Flavonoide selbst für die beobachtete Stimulierung der Protein- und RNA-Synthese verantwortlich sind.

Diese Annahme wird im nächsten Experiment bestätigt, welches die Metabolisierung von EA-3 in Leberhomogenaten zeigt.

2.6 Taxifolin, ein Spaltmetabolit von EA-3 in Leberhomogenaten

Zu einem Leberhomogenat wurde das Biflavonoid EA-3 in wenig DMSO gelöst zugesetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert und dann das Inkubationsgemisch intensiv mit EtOAc extrahiert. Aliquote Teile der extrahierbaren Substanzen wurden mit β -Glucuronidase und Arylsulfatase behandelt und alle Extrakte dunnschichtchromatographisch aufgetrennt (Abb. 19).

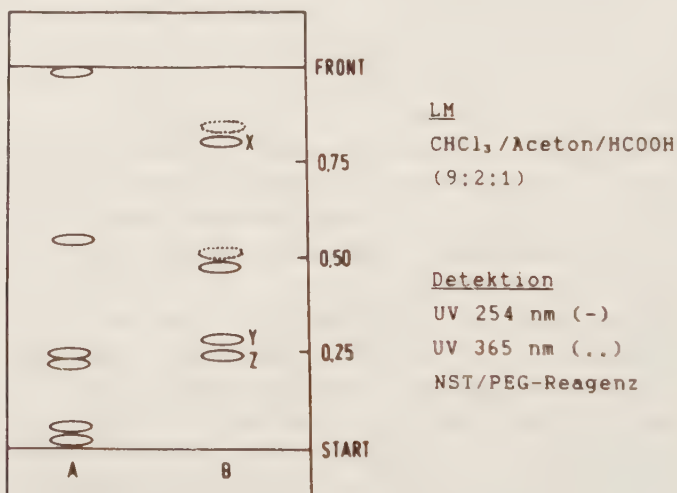


Abb. 19 Auftrennung und DC-Vergleich von EtOAc löslichen Metaboliten von EA-3 nach Behandlung mit Leberhomogenisat (A); EtOAc-Fraktion nach Behandlung mit β -Glucuronidase und Arylsulfatase (B)

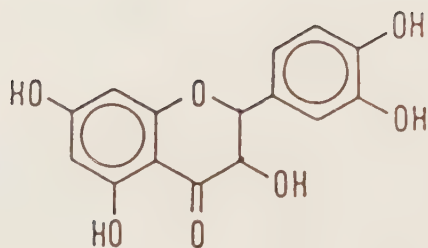
Wie aus Abb. 19 ersichtlich ist, wird EA-3 nach Inkubation mit Leberhomogenisat in mindestens 6 Verbindungen

umgewandelt. 16 mg EA-3 wurden eingesetzt. Mit Hilfe von β -Glucuronidase und Arylsulfatase können offensichtlich konjugierte EA-3-Metaboliten wieder gespalten werden. Die Zonen wurden nach absteigendem R_f -Wert als Banden X, Y und Z bezeichnet.

Die Reindarstellung der EA-3-Metaboliten nach Enzymbehandlung erfolgte durch präparative Dunnschichtchromatographie. Durch Elution mit Aceton wurden aus den Kieselgelplatten 0.4 mg X, 2.0 mg Y und 0.8 mg Z erhalten. Durch UV-, IR-, $^1\text{H-NMR}$ -, Massenspektroskopie und vergleichende DC-Analysen konnte Komponente Z als unverändertes EA-3 und Y als Taxifolin charakterisiert werden.

Von der Menge her, kann Taxifolin als Hauptmetabolit von EA-3 im Rattenleberhomogenat angesehen werden, d.h. die I-3/II-8-Verknüpfung von EA-3 wird durch cytoplasmatische Enzyme gespalten, die I-3' Stelle durch ein Monooxygenasesystem hydroxyliert. Die kombinierte Spaltung mit β -Glucuronidase und Arylsulfatase deutet an, daß im Cytosol der überwiegende Teil des EA-3-Metaboliten als Glucuronid bzw. Sulfat vorlag.

Von SONNENBICHLER und POHL (1980) ist die stimulierende Wirkung von Taxifolin auf die RNA-Synthese in isolierten Zellkernen bereits beschrieben worden. Es enthält alle für die Wirkung an der RNA Polymerase I notwendig erscheinenden Strukturmerkmale.



Taxifolin

Ein weiteres Verfolgen des Wirkungsmechanismus von EA-3 erschien nach diesem Resultat unangebracht.

3. Untersuchung zur Beeinflussung der Precursoraufnahme in Hepatozyten durch die Garcinia-Biflavonoide

3.1 Beeinflussung der Precursoraufnahme in Zellkulturen in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen der Garcinia-Biflavonoide

In Teil III.2 konnte gezeigt werden, daß die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide EA-2 und EA-3 wie Silibinin die Protein- und RNA-Syntheserate in Hepatozyten beeinflussen. In hohen Flavonoidkonzentrationen traten allerdings scheinbare Hemmeffekte bei der Makromolekul-Synthese auf. Sehr wichtig für die Interpretation dieser Feststellung war, die Möglichkeit auszuschließen, daß die Flavonoide die Precursorkonzentrationen in der Leberzelle beeinflussen z.B. die radioaktiven Precursor vermindern. Unterschiedliche Precursorpools in den zu vergleichenden Zellen wurden zwangsläufig zu unterschiedlichen spezifischen Radioaktivitäten der neusynthetisierten Nucleinsäuren und Proteine führen. Um dies abzuklären, wurde die Aufnahme von ^3H -Uridin, ^{35}S -Methionin und ^3H -Thymidin in isolierte Ratten-Hepatozyten unter dem Einfluß des Garcinia-Biflavonoids EA-3 und Silibinin untersucht. Aus Mangel an Substanz wurde EA-2 in diesen Versuchsreihen nicht eingesetzt.

3.1.1 Zeitverlauf der Uridinaufnahme in Hepatozyten unter dem Einfluß von EA-3 und Silibinin

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob EA-3 bzw. Silibinin die Aufnahme von Uridin in Ratten-Hepatozyten beeinflusst. Zu Zellkulturen, die ohne bzw. mit Testsubstanz vorinkubiert worden waren, wurde ^3H -Uridin zugesetzt und die in die Zellen aufgenommene ^3H -Uridinmenge nach verschiedenen Zeiten gemessen. Hierzu wurden 0 bis 20 min nach Zugabe des radioaktiven Uridins zum Medium die Hepatozyten aus dem Inkubationsmedium durch Zentrifugation abgetrennt, 2 min gewaschen, mit TCA versetzt und dann die lösliche Radioaktivität bestimmt. Die Werte für 10 und 20 min sind in Tab. 6 angegeben.

Tab. 6 Aufnahme von ^3H -Uridin in Ratten-Hepatozyten (cpm/ 5.0×10^4 Zellen) ohne und nach Vorbehandlung mit EA-3 bzw. Silibinin ($9\mu\text{M}$ und $900\mu\text{M}$); Mittelwerte aus 3 Bestimmungen

Zeit Kontrolle (min)	EA-3 ($9\mu\text{M}$)	Sil. ($9\mu\text{M}$)	EA-3 ($900\mu\text{M}$)	Sil. ($900\mu\text{M}$)
10	2712 ± 46	2708 ± 52	2756 ± 56	1980 ± 44
20	2771 ± 47	2742 ± 13	2767 ± 37	2039 ± 79
				1807 ± 45
				1830 ± 66

Aus Tab. 6 kann entnommen werden, daß in Anwesenheit von niederen Konzentrationen ($9\mu\text{M}$) EA-3 bzw. Silibinin die Precursoraufnahme in die Hepatozyten unbeeinflusst bleibt. Beim Vergleich der ^3H -Uridinaufnahme in Hepatozyten, die mit $900\mu\text{M}$ EA-3 bzw. Silibinin vorbehandelt worden waren, ist jedoch im Vergleich zu den Kontrollen ohne Flavonoidzusatz eine deutliche Hemmung der Uridinaufnahme feststellbar. EA-3

hemmt um ca 27 %, Silibinin um ca 34 %.

Die eingesetzten Testsubstanzkonzentrationen entsprachen einerseits 9 μM , nämlich der für eine Stimulierung (Abb. 15) der RNA-Synthese in Ratten-Hepatozyten optimal gefundenen Menge, andererseits 900 μM , einer Konzentration bei der die ^3H -Uridineinbaurate in RNA stark vermindern wird (Abb. 16). Um festzustellen, ob dieser "Membraneffekt" verallgemeinert werden darf oder spezifisch für Rattenleberzellen ist, wurden die Versuche auch mit isolierten Maus-Hepatozyten sowie mit schnellwachsenden menschlichen Hepatomzellen der Zelllinie Alexander durchgeführt. In diesen Zellkulturen wurde die Aufnahme des ^3H -Uridins unter dem Einfluß der Testverbindungen ähnlich wie bei Ratten-Hepatozyten beeinflusst: Ca 1 min nach Gabe von radioaktivem Uridin wächst der Gehalt an ^3H -Uridin in den Zellen und erreicht nach 10 min ein Plateau. Eine niedere Konzentration der Testsubstanzen (9 μM) beeinflusst die Uridinaufnahme nicht. Bei hoher Konzentration (900 μM) hemmt EA-3 die ^3H -Uridinaufnahme in Maus-Hepatozyten um ca 14 % und in Alexander-Zellen um ca 12 %. 900 μM Silibinin inhibiert die Aufnahme bei den untersuchten Zellen in ähnlicher Weise.

In Ratten- und Maus-Hepatozyten, sowie in Alexander-Zellen wird die Aufnahme von ^3H -Uridin durch kleine EA-3- bzw. Silibininkonzentrationen nicht beeinflusst. Der in der Zeiteinheit erhöhte Uridineinbau in neusynthetisierte RNA der mit niedrigen Konzentrationen EA-3 bzw. Silibinin inkubierten Zellen ist also nicht die Folge eines größeren Precursorangebots in den Hepatozyten, d.h. die Annahme einer Stimulierung der RNA-Synthese ist gerechtfertigt.

Die scheinbare reduzierte RNA-Synthese (Abb. 16, S.48) in Gegenwart hoher Konzentrationen EA-3 bzw. Silibinin ist aber nach den eben dargelegten Meßdaten nicht das Ergebnis einer Transkriptionshemmung, sondern einfach die Folge der verminderten Aufnahme der Menge an ^3H -Uridin, des zur Markierung der RNA eingesetzten radioaktiven Bausteins in den Zellen.

3.1.2 Uridinaufnahme in Ratten-Hepatozyten in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von EA-3 bzw. Silibinin

Wie oben gezeigt, können das Garcinia-Flavonoid EA-3 und Silibinin in hoher Konzentration die Uridinaufnahme in Leberzellen hemmen. Um die Frage abzuklären, bei welcher Konzentration die Hemmwirkung beobachtbar wird, wurde die Uridinaufnahme unter dem Einfluß unterschiedlicher EA-3- bzw. Silibininkonzentrationen gemessen.

Da nach den vorausgehenden Erfahrungen der Uridinpegel nach 10 min eine gut meßbare und längerer Zeit gleichbleibende Höhe erreicht, wurden die Messungswerte dieses Zeitpunkts in Abb. 20 aufgetragen. Die aufgenommene ^3H -Uridinmenge wurde wieder als die in den Zellen befindliche TCA-losliche Radioaktivität bestimmt.

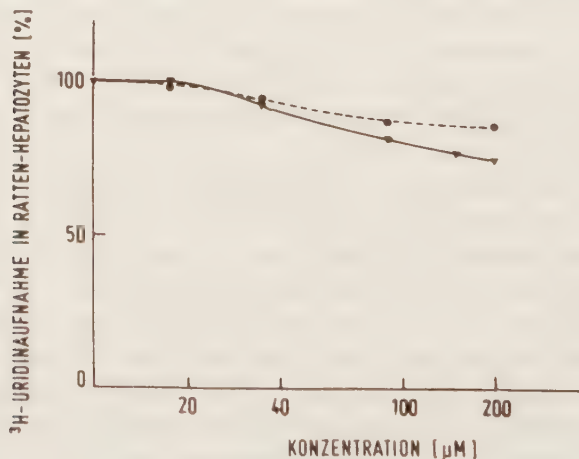


Abb. 20 Konzentrationsabhängigkeit der durch EA-3- ($\bullet$) und Silibinin- ($\blacktriangledown$) beeinflussten ^3H -Uridinaufnahme in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^4 Zellen/ml) nach 10 min Inkubation

Aus Abb. 20 wird ersichtlich, daß mit zunehmender EA-3- bzw. Silibininkonzentration die ^3H -Uridinaufnahme in Ratten-Hepatozyten mehr und mehr gehemmt wird. Die Konzentrationen, bei der die ersten Hemmeffekte sichtbar werden, liegen für EA-3 und für Silibinin bei ca 20 μM .

Wiederholungen des Experiments mit Maus-Hepatozyten und Alexander-Zellen zeigten erstaunlicherweise, daß eine Hemmung bei Maus-Hepatozyten erst bei 179 μM beginnt, in Alexander-Zellen umgekehrt schon ab 9 μM .

3.1.3 Methioninaufnahme in Ratten-Hepatozyten unter dem Einfluß von EA-3 und Silibinin

Nachdem die hier untersuchten Flavonoide in höheren Konzentrationen bei Hepatozyten in Kultur zu einer Verminderung der Uridinaufnahme führten, war die Frage zu klären, inwieweit auch die Transportsysteme und Membranpermeabilität für andere Precursoren durch die Testverbindungen beeinflusst werden. In folgender Versuchsreihe wurde untersucht, ob auch der Einstrom von ^{35}S -Methionin bei Hepatozyten in Kultur durch EA-3 bzw. Silibinin beeinflusst wird. Dabei wurden die für die Protein-Synthese verfügbaren intrazellulär kompartimentierten Aminosäurepools (ILAN & SINGER, 1975; GRUMMT, 1977; VIDRICH et al., 1977) im einzelnen nicht bestimmt, sondern lediglich die Gesamtmethioninaufnahme in "behandelten und unbehandelten" Zellen verglichen. Das aufgenommene ^{35}S -Methionin wurde wieder nach verschiedenen Zeiten als TCA-losliche Radioaktivität in den Hepatozyten gemessen (Tab. 7).

Tab. 7 Aufnahme von ^{35}S -Methionin in Ratten-Hepatozyten (cpm/ 5.0×10^4 Zellen) in Gegenwart von EA-3 bzw. Silibinin ($9\mu\text{M}$ und $900\mu\text{M}$); Mittelwerte aus 3 Bestimmungen

Zeit	Kontrolle	EA-3	Sil.	EA-3	Sil.
(min)		($9\mu\text{M}$)	($9\mu\text{M}$)	($900\mu\text{M}$)	($900\mu\text{M}$)
10	1864 ± 44	1847 ± 39	1906 ± 99	1454 ± 61	1314 ± 4
20	2081 ± 62	2043 ± 15	2157 ± 79	1623 ± 37	1426 ± 13

Bei Hepatozyten, die mit einer geringen Mengen der Testsubstanzen ($9\mu\text{M}$) behandelt worden waren, konnte kein signifikanter Unterschied zur Aufnahme bei den Kontrollzellen festgestellt werden. Die Aufnahme von ^{35}S -Methionin in Ratten-Hepatozyten wird durch kleine Konzentration EA-3 und Silibinin nicht beeinflusst.

Wie aus Tab. 7 hervorgeht, hemmt EA-3 mit $900\mu\text{M}$ aber schon nach 10 min Inkubation die ^{35}S -Methioninaufnahme um ca 22 %, Silibinin um ca 30 %.

^{35}S -Methioninaufnahmeversuche mit Maus-Hepatozyten und mit der Hepatomzelllinie Alexander ergaben ein ähnliches Resultat. Der Gehalt an radioaktivem Methionin in den Zellen erreicht ca 15 min nach Zugabe von ^{35}S -Methionin zum Medium nahezu ein Plateau. Bei der hohen Konzentration von $900\mu\text{M}$ Silibinin wird die Precursoraufnahme in Maus-Hepatozyten um 26 % und in Alexander-Zellen um 9 % reduziert. EA-3 inhibiert die ^{35}S -Methioninaufnahme in Maus-Hepatozyten in einer Konzentration von $900\mu\text{M}$ um 20 % und in Alexanderzellen um 6 %.

3.1.4 Methioninaufnahme in Ratten-Hepatozyten unter dem Einfluß unterschiedlicher Mengen EA-3 bzw. Silibinin

In den folgenden Versuchen wurde die Anfangskonzentration der Hemmwirkung von EA-3 bzw. von Silibinin auf die Methioninaufnahme in Hepatozyten bestimmt (Abb. 21). Die Versuchsdurchführung erfolgte wie bei den Experimenten mit Uridin beschrieben (S.62).

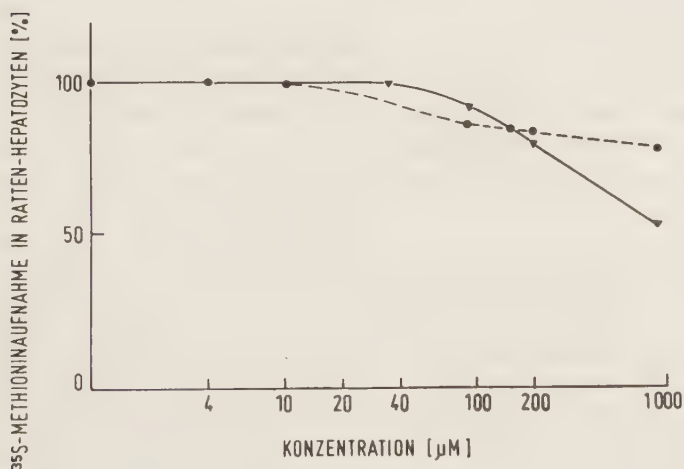


Abb. 21 Methioninaufnahme in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^4 Zellen/ml) nach einer Vorbehandlung (10 min) der Hepatozyten mit steigenden Konzentrationen an EA-3 (●) bzw. Silibinin (▼)

Wie man aus Abb. 21 entnehmen kann, wird unter dem Einfluß von EA-3 bzw. Silibinin die ^{35}S -Methioninaufnahme in Ratten-Hepatozyten mit steigender Konzentration reduziert. Der Beginn einer Hemmwirkung liegt für EA-3 bei ca. $11 \mu\text{M}$, für Silibinin bei ca. $35 \mu\text{M}$. $900 \mu\text{M}$ EA-3 hemmen die Aufnahme

um ca 22 %, , Silibinin um 36 %. In Versuchen mit Maus-Hepatozyten und menschlichen Hepatomzellen liegen die Anfangskonzentrationen der Hemmung der Methioninaufnahme bei ca 42 μM in Maus-Hepatozyten und 160 μM in Alexander-Zellen. Niedrige Konzentrationen beeinflussen bei allen untersuchten Zelltypen die Methioninaufnahme nicht.

3.1.5 Beeinflussung der Thymidinaufnahme in Ratten-Hepatozyten durch Silibinin

Radioaktives Thymidin ist der übliche Precursor für die Analyse der DNA-Synthese in Zellkulturen. In Hepatozyten, in denen keine Phosphorylierung durch die Thymidin-Kinase abläuft, wird Thymidin durch ein "high-affinity"- und "low-affinity"-Transportsystem aufgenommen, die im Tandem arbeiten (UNGEMACH u. HEGNER, 1978).

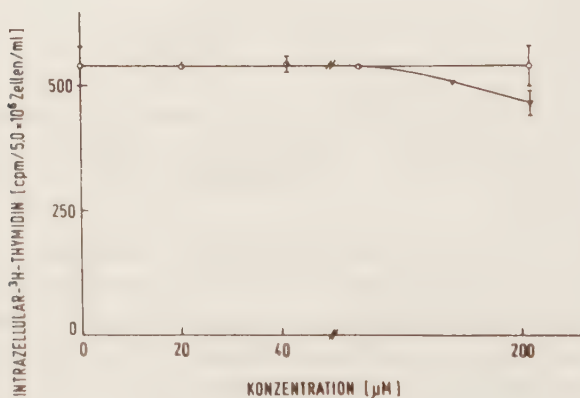


Abb. 22 Konzentrationsabhängigkeit der ^3H -Thymidinaufnahme (cpm/ 5.0×10^4 Zellen) in Ratten-Hepatozyten ohne (o) und unter (▼) dem Einfluß von Silibinin nach einer Inkubationszeit von 10 min

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob Silibinin auch die Membranpermeabilität von Thymidin beeinflusst. Zu Zellkulturen, die ohne bzw. mit verschiedenen Konzentrationen an Silibinin vorinkubiert worden waren, wurde ^3H -Thymidin zugesetzt und die in die Zellen aufgenommene ^3H -Thymidinmenge nach 10 min gemessen (Abb. 22).

Bis zur Konzentration von $80\ \mu\text{M}$ Silibinin in den Hepatozyten-Suspensionen wird kein Einfluß auf die ^3H -Thymidinaufnahme sichtbar. Ein Hemmeffekt beginnt bei ca $90\ \mu\text{M}$ Silibinin.

3.2 Diskussion der Versuche zur Hemmung der Precursoraufnahme in Hepatozyten durch höhere Konzentrationen der Garcinia-Flavonoide bzw. Silibinin

Die reduzierte ^3H -Uridin-, ^{35}S -Methionin und ^3H -Thymidinaufnahme in Ratten- und Maus-Hepatozyten unter dem Einfluß hoher EA-3- bzw. Silibininkonzentrationen kann verschiedene Ursachen haben :

1) Der Effekt beruht möglicherweise auf einer Hemmung des spezifischen Transportsystems für die Precursoren. Für die untersuchten Nucleinsäurebausteine besteht ein gemeinsamer Transportweg (UNGEMACH & HEGNER, 1978), der durch nucleosid-ähnliche Stoffe gehemmt werden kann (TAUBE, 1972). Für eine Hemmung ist allerdings eine strukturelle Ähnlichkeit des Hemmstoffs z.B. Persantin (SCHOLTISSEK, 1968) mit dem normalen Substrat Voraussetzung, was für EA-3 und Silibinin kaum angenommen werden kann.

2) Neben einer spezifischen Hemmung des Transportsystems konnten bei Flavonoiden allerdings auch **unspezifische** Wechselwirkungen der Substanzen mit der Zellmembran vorliegen, mit der Folge einer allgemeinen Permeabilitätsein-

schränkung. Die Klärung der Frage, ob die hier untersuchten Flavonoide die Blockade von spezifischen Transportsystemen bewirken können oder unspezifisch die Permeabilität der Hepatozytenmembran beeinflussen, ist von einiger Bedeutung. Zum Beispiel wurden zu Beginn der Untersuchungen als Test für antihepatotoxische Wirksamkeit die Effekte der Garcinia-Inhaltsstoffe EA-3 und EA-2, sowie von Silibinin auf die GalN- und CCl₄-induzierte Schädigung von Hepatozytenkulturen beschrieben. Nach den zuletzt diskutierten Möglichkeiten ist fraglich, ob dieser Effekt auf dem Wege der Beeinflussung der Makromolekül-Synthese (z.B. GPT-Synthese) oder über einen möglichen Effekt auf die Permeabilität der Zellmembran zustande kommt. Es ist denkbar, daß bei höheren Konzentrationen von Testsubstanzen wie EA-3 oder Silibinin die Aufnahme dieser Hepatotoxine in die Zelle verhindert wird, und damit die Noxen gar nicht zum Wirkort kommen. Um die Art der beobachteten Hemmwirkung zu erkennen, wurde deshalb zusätzlich die Aufnahme einiger anderer niedermolekularer Verbindungen (mit anderen Transportsystemen) in Hepatozyten in Gegenwart von EA-3 bzw. Silibinin untersucht. Gewählt wurden radioaktiv markiertes Galactosamin (GalN), α -Aminoisobutyrat (AIB) und $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

3.2.1 Einfluß von EA-3 und Silibinin auf die D-Galactosaminaufnahme in Ratten-Hepatozyten

Die Aufnahme von ^3H -Galactosamin (Spez. Akt. 12,4 Ci/mmol) unter dem Einfluß von EA-3 bzw. Silibinin wurde zeit- und konzentrationsabhängig untersucht, die Durchführung der Versuche erfolgte wie in den Abschn. 3.1.1, S.60 und 3.1.4, S.65 beschrieben, die Ergebnisse sind in Tab. 8 und in Abb. 23 dargestellt.

Tab. 8 Aufnahme von ^3H -Galactosamin in Ratten-Hepatozyten (cpm/ 5.0×10^6 Zellen) in Gegenwart von EA-3 bzw. Silibinin ($9\mu\text{M}$ und $900\mu\text{M}$); Mittelwerte aus 3 Bestimmungen

Zeit	Kontrolle	EA-3	Sil.	EA-3	Sil.
(min)		($9\mu\text{M}$)	($9\mu\text{M}$)	($900\mu\text{M}$)	($900\mu\text{M}$)
10	2471 ± 59	2463 ± 96	2375 ± 90	820 ± 50	1914 ± 65
20	2720 ± 84	2717 ± 62	2701 ± 43	925 ± 58	2007 ± 55
30	2938 ± 68	2996 ± 56	3006 ± 66	1037 ± 62	2126 ± 90

Wie man aus Tab. 8 entnehmen kann, erfolgt die Aufnahme von ^3H -Galactosamin in die Leberparenchymzellen von unbehandelten Kontrollen und in die mit $9\mu\text{M}$ EA-3 oder Silibinin behandelten Zellen etwa gleich. Niedrige Konzentration der untersuchten Verbindungen beeinflussen die ^3H -GalN-Aufnahme in Ratten-Hepatozyten nicht. Bei hohen Konzentration ($900\mu\text{M}$) hemmt allerdings EA-3 die Aufnahme um ca 67 %, Silibinin um 23 - 36 %.

Experimente, mit verschiedenen Mengen an Testsubstanzen (10 min Werte) zeigen die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung (Abb. 23).

Aus den Daten von Abb. 23 geht hervor, daß EA-3 und Silibinin die ^3H -GalN-Aufnahme in Ratten-Hepatozyten mit steigender Konzentration zunehmend inhibieren. Die Anfangskonzentration, bei der Hemmung auftritt, liegt bei EA-3 bei ca $15\mu\text{M}$, bei Silibinin bei $36\mu\text{M}$.

Experimente mit Maus-Hepatozyten bzw. Alexander-Zellen ergaben ein ähnliches Ergebnis.

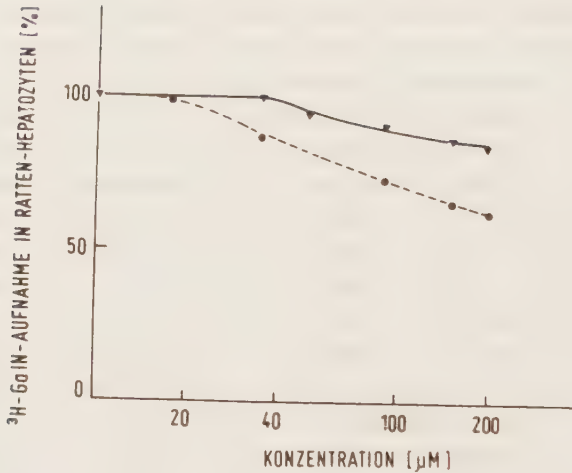


Abb. 23 Konzentrationsabhängigkeit der durch EA-3 (●) und Silibinin (▼) beeinflussten ^3H -GalN-Aufnahme in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^6 Zellen/ml) nach 10 min Inkubation

In zahlreichen Untersuchungen (HIKINO, H., 1984; HIKINO et al., 1984) wird die Methode von KISO et al. (1983a; 1983b) als orientierendes Testmodell für das Screening potentiell leberwirksamer Drogen eingesetzt. In diesem Testsystem werden Hepatozyten in Kultur durch CCl_4 oder D-Galactosamin geschädigt. Das Ausmaß der Schädigung wird mit dem Austritt der leberspezifischen, cytosolischen Transaminase GPT durch die geschädigte Plasmamembran der Hepatozyten korreliert. Je nach hepatoprotektiver Potenz einer Substanz wird die GPT-Freisetzung mehr oder weniger stark gehemmt.

Sehr wichtig für die Interpretation der Ergebnisse dieses Testes ist aber die Annahme, daß die getesteten Substanzen die Eigenschaften der Zellmembran nicht verändern und dadurch etwa die Aufnahme von GalN bzw. CCl_4 in die Zellen

einschränken. Wenn kein Hepatotoxin in die Zelle gelangen, ist auch keine Schädigung des Hepatozytenstoffwechsels zu erwarten, d.h., wenn die toxischen Verbindungen nur mehr vermindert in die Zelle gelangen, wird weniger Schaden angerichtet.

Wie oben beschrieben hemmen die untersuchten Garcinia-Flavonoide bzw. Silibinin mit steigender Konzentration die Aufnahme von GalN. Unter diesen Umständen kann die Brauchbarkeit des skizzierten Tests auf Leberschutzwirkung in Frage gestellt werden, sobald höhere Substanzkonzentrationen eingesetzt werden. Allerdings ist kein Effekt durch kleine Mengen EA-3 sowie Silibinin auf die Permeation von D-Galactosamin feststellbar. Die kritische Grenze liegt für alle untersuchten Substanzen bei ca 20 μ M. Die Methode von KISO et al. (1983a, 1983b) ist daher als Test für das Screening potentiell antihepatotoxischer Drogen nur für niedere Flavonoidkonzentrationen brauchbar.

3.2.2 Beeinflussung der α -Aminoisobutyrat-Aufnahme in Ratten-Hepatozyten durch EA-3 und Silibinin

Eine Schwierigkeit bei allen bisher geschilderten Versuchen zur Aufnahme von Precursoren in Hepatozyten liegt darin, daß die verwendeten radioaktiv markierten Vorstufen in den Leberzellen nach ihrer Aufnahme einerseits metabolisiert, andererseits zum Teil in neusynthetisierte Makromoleküle der Zelle eingebaut werden können. Dies bedeutet, daß man z.B. die exakte 35 S-Methioninaufnahme in die Zellen mit der hier benutzten Technik nicht ermitteln kann. Dies gilt nicht für die Aufnahme von 3 H- α -Aminoisobutyrat (Spez. Akt. 52.6 mCi/mmol) in Ratten-Hepatozyten unter dem Einfluß von EA-3 bzw. Silibinin. AIB, ein Aminosäureanalog wird weder metabolisiert noch in neusynthetisierte Proteine der Zelle eingebaut (DONNER et al., 1978). Außerdem wird AIB durch das aktive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Carriersystem (sog. A-System) in die Zelle transportiert (LE CAM & FREYCHET, 1977).

Abb. 24 zeigt den Einfluß von hohen Konzentration EA-3 bzw. Silibinin auf die ^3H - α -AIB-Aufnahme in Ratten-Hepatozyten.

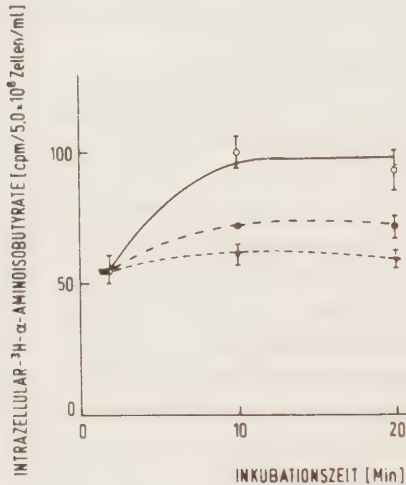


Abb. 24 Zeitabhängigkeit der ^3H - α -AIB-Aufnahme in Ratten-Hepatozyten (cpm/5.0 x 10⁶ Zellen) ohne (o) und unter den Einfluß von jeweils 900 μM EA-3 (●) und Silibinin (▼)

Wie aus Abb. 24 entnommen werden kann, steigt der Gehalt an radioaktivem α -AIB in den Ratten-Hepatozyten schnell an und erreicht nach 10 min ein Maximum. Nach 15 min flacht der Effekt ab. Die Zellen der Kontrollen nehmen mehr α -AIB auf als die mit Testsubstanzen inkubierten Hepatozyten.

Bei Untersuchungen der Konzentrationsabhängigkeit des Hemmeffektes ergab sich Abb. 25.

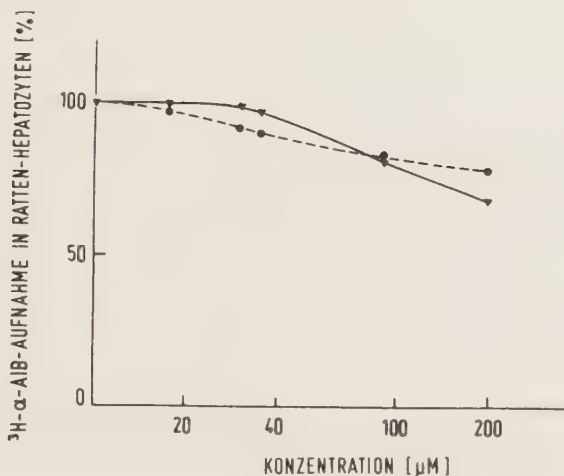


Abb. 25 Konzentrationsabhängigkeit der durch EA-3 (●) bzw. Silibinin (▼) beeinflussten ^3H - α -AIB-Aufnahme in Ratten-Hepatozyten (5.0×10^4 Zellen/ml) nach 10 min Inkubation

Bis $12 \mu\text{M}$ EA-3 bzw. $26 \mu\text{M}$ Silibinin in den Hepatozyten-Suspensionen ist kein Hemmeffekt auf die ^3H -AIB-Aufnahme festzustellen. Allerdings wird dann die Aufnahme in Gegenwart steigender Konzentrationen der Testsubstanzen zunehmend inhibiert. EA-3 und Silibinin beeinflussen also die Aufnahme von AIB ähnlich wie bei Uridin, Methionin, Thymidin oder GalN.

Für die untersuchten Vorstufen sind unterschiedliche Transportsysteme in der Zellmembran vorhanden. EA-3 und Silibinin scheinen also unspezifisch eine Hemmung der verschiedenen Transportwege durch die Zellmembran zu bewirken.

3.2.3 Beeinflussung der Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in Ratten-Hepatozyten durch EA-3 und Silibinin

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob der Transport durch die Membran auch für Ionen wie Ca^{2+} durch EA-3 bzw. Silibinin beeinflusst wird. Hierfür wurde die Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Spez. Akt. 35.03 mCi/mg) in vitro in isolierte Hepatozyten gemessen. Wiederum wurde die TCA-losliche Radioaktivität in den Zellen bestimmt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 26 und 27 wiedergegeben.

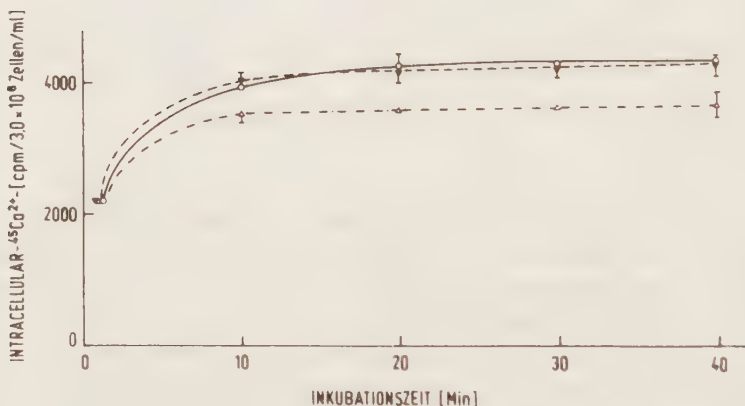


Abb. 26 Zeitabhängigkeit der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Ratten-Hepatozyten (cpm/5 x 10^6 Zellen) ohne (o), unter dem Einfluß von 9 μM EA-3 (∇) und 900 μM EA-3 (Δ)

Abb. 26 zeigt den zeitlichen Einfluß von EA-3 auf die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Ratten-Hepatozyten. Der Gehalt an $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in den Zellen steigt an und erreicht nach 10 min nahezu ein Plateau. In Anwesenheit von 9 μM EA-3 bleibt die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme unbeeinflusst, mit 900 μM EA-3 wird die Aufnahme um ca

20 % inhibiert.

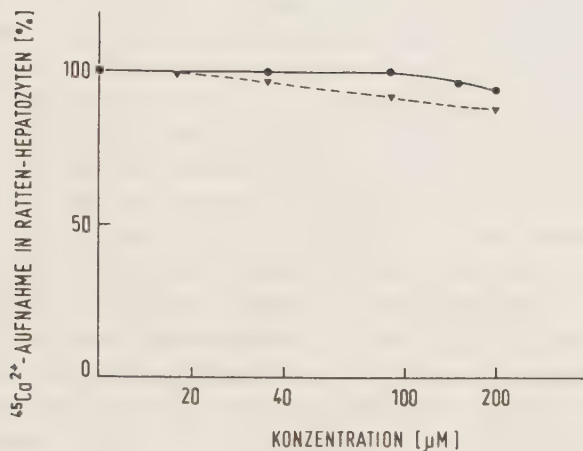


Abb. 27 Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (cpm/ 5.0×10^6 Zellen) in Ratten-Hepatozyten unter dem Einfluß von EA-3 ($\bullet$) und Silibinin ($\blacktriangledown$) nach 10 min Inkubation

Abb. 27 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Flavonoidwirkung auf die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Ratten-Hepatozyten. Ein erkennbarer Hemmeffekt von Silibinin tritt bei 100 μM auf, von EA-3 bereits bei ca 17 μM .

3.2.4 Diskussion zur Beeinflussung der Membranpermeabilität durch die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide

Vorausgehende Experimente haben gezeigt, daß kleine Konzentrationen der Garcinia-Flavonoide EA-3 und EA-2 (wie auch Silibinin) die Protein- und RNA-Synthese stimulieren. Mit steigender Flavonoidkonzentration wird allerdings die Precursoreinbaurrate in neusynthetisierte Makromoleküle vermindert. Untersuchungen von SONNENBICHLER et al. (1986) haben schließlich gezeigt, daß auch die DNA-Synthese in teilhepatektomierten Rattenlebern unter dem Einfluß kleiner Silibininkonzentrationen gesteigert wird.

Zur Messung der RNA-Synthese wird ^3H -Uridin als spezifischer Baustein der RNA, zur Messung der Protein-Synthese radioaktives Leucin bzw. Methionin als spezifischer Bestandteil der Proteine eingesetzt; zur Messung der DNA-Synthese wird ^3H -Thymidin verwendet. In allen Fällen gibt die Menge des in der Zeiteinheit in Makromoleküle eingebauten radioaktiven Precursors ein Maß für die Synthesegeschwindigkeit.

Entscheidend in der Interpretation dieser Experimente ist, die Möglichkeit auszuschließen, daß die Flavonoide die Precursorkonzentrationen in der Leberzelle beeinflussen und radioaktive Vorläufer dadurch erhöht bzw. vermindert zur Verfügung stehen. Unterschiedliche Precursorpools in den zu vergleichenden Zellen wurden - auch ohne Änderung der Syntheserate - zwangsläufig Differenzen in der spezifischen Radioaktivität der neusynthetisierten Makromoleküle bedingen. Zur Kontrolle wurde deshalb stets die Aufnahme der Bausteine ^3H -Uridin, ^3S -Methionin und ^3H -Thymidin in die Leberzellen unter dem Einfluß der Garcinia-Biflavonoide und von Silibinin untersucht.

Es zeigte sich, daß die Aufnahme der untersuchten Vorstufen in Ratten- und Maus-Hepatozyten sowie in menschliche Hepatomzellen der Zelllinie Alexander unter dem Einfluß niedriger Konzentrationen des Garcinia-Biflavonoids EA-3 wie auch durch Silibinin im Vergleich zu unbehandelten Zelllinien

ungestört bleibt. Unter dem Einfluß hoher Konzentrationen der Flavonoide wird jedoch die Aufnahme der untersuchten Vorläufer inhibiert. Dies bedeutet :

1) Die in der Zeiteinheit erhöhte Einbaurrate des radioaktiven Uridins in neusynthetisierte RNA oder von Aminosäuren in Proteine in Gegenwart von niedrigen Konzentrationen der Garcinia-Flavonoide EA-3 und EA-2, sowie auch Silibinin ist nicht die Folge eines vergrößerten Precursorangebots in den Hepatozyten.

2) Die von SONNENBICHLER et al. (1986) beobachtete Steigerung der DNA-Synthese in teilhepatektomierten Rattenlebern durch kleine Silibininkonzentration ist nicht die Konsequenz eines erhöhten Thymidinangebots in der Zelle.

3) Da ein direkter Zusammenhang zwischen der Precursoraufnahme und dem Precursoreinbau in Makromoleküle besteht (WEBER & RUBIN, 1970; PLAGEMANN, 1970), ist die von uns beobachtete Verminderung des Precursoreinbaus in neusynthetisierte RNA bzw. Proteine unter dem Einfluß hoher Konzentrationen Garcinia-Flavonoide bzw. Silibinin als Folge einer gehinderten Precursoraufnahme zu erklären: Die RNA- und die Protein- sowie die DNA-Syntheserate wird bei höheren Flavonoidkonzentrationen nur scheinbar gehemmt. Die Aufnahme der radioaktiven Precursor in die Zelle ist vielmehr blockiert und läßt die Synthesegeschwindigkeit kleiner erscheinen. Damit wird auch der Befund erklärlich, daß eine Vorinkubation von Hepatozyten mit EA-3 bzw. Silibinin zu einer deutlich stärkeren Reduktion der "Syntheseraten" d.h. Einbauraten führt als ohne Vorbehandlung.

Als denkbarer Mechanismus für die Reduktion der Precursoraufnahme bietet sich an, daß die Flavonoide in höheren Konzentrationen die spezifischen Transportsysteme hemmen. Aber auch eine allgemeine Wechselwirkung mit Zellmembrankomponenten, verbunden mit einer unspezifischen Inhibierung der Membranpermeabilität für die verschiedenen Precursoren, konnte der Grund sein. Um dies abzuklären, wurde auch die

Permeation von Verbindungen untersucht, die andere Transportwege haben wie z.B. Galactosamin, α -Aminoisobutyrat und Calcium-Ionen.

In den vorstehend beschriebenen Versuchen wurde gefunden, daß niedrige EA-3- bzw. Silibininkonzentrationen ($< 10 \mu\text{M}$) die Aufnahme aller drei genannten Substrate nicht beeinflussen. Mit steigender Flavonoidkonzentration wird jedoch die Aufnahme von ^3H -GalN und ^3H - α -AIB, sowie auch $^{45}\text{Ca}^{2+}$ deutlich inhibiert.

Für diese untersuchten radioaktiv markierten Moleküle sind gänzlich unterschiedliche Transportwege in der Zellmembran vorhanden. Für die Hemmung durch EA-3 bzw. Silibinin sollte man deshalb mit einem allgemeinen, **unspezifischen** Membraneffekt rechnen.

So weit es das Testmodell von KISO et al. (1983a, 1983b) betrifft, ist mit niedriger Konzentration an Flavonoiden die Eigenschaft der Zellmembran nicht so verändert, daß dadurch etwa die Aufnahme von GalN bzw. CCl_4 in die Zellen eingeschränkt wird, d.h. die Hepatotoxine gelangen ungehindert in die Zellen und können die bekannten Schäden an der Hepatozytenmembran und die daraus resultierende erhöhte GPT-Freisetzung bewirken. Unter erhöhten Flavonoidkonzentrationen ($> 20 \mu\text{M}$) wird nach unseren Befunden allerdings die Eigenschaft der Zellmembran so geändert, daß die Permeation der Hepatotoxine in die Zellen blockiert wird. Wenn kein Hepatotoxin in der Zelle gelangt, ist auch keine Schädigung des Hepatozytenstoffwechsels zu erwarten. Die beobachtete Schutzwirkung höherer Konzentrationen Garcinia-Biflavonoide bzw. Silibinin gegen GalN- bzw. CCl_4 -induzierte Schädigungen in Hepatozyten ist also nur ein Membraneffekt bezüglich der Toxinaufnahme.

Unter diesen Umständen muß die Brauchbarkeit des Tests von KISO et al. (1983a, 1983b) für Stoffe mit Leberschutzwirkung in Frage gestellt werden, sobald Substanzkonzentrationen größer als $20 \mu\text{M}$ eingesetzt werden.

Was ist nun die Ursache für diese Membranblockade durch hohe Dosen der Flavonoide?

Die Bindung von Phenolen an Protein ist eine lang bekannte Erscheinung (HASLAM & LILLEY, 1986). Es könnte sein, daß bei hohen Flavonoidkonzentrationen eine (**unspezifische**) **Wechselwirkung** der Arylringe über die phenolischen OH-Gruppen mit **Membranproteinen** (SCHRIEWER & RUTKOWSKI, 1973) oder mit **Membranlipiden** (RING et al., 1973; WISSEMAN, 1978) zustande kommt. Assoziationen und Bindungen dieser Art sind auch für Flavonoide beschrieben worden (LEFEVRE, 1959; DIEDRICH & STRINGHAM, 1970; RING et al., 1977; ROBINSON et al., 1979). Diese Art Wechselwirkung konnte die Zellmembran so verändern, daß die Aufnahme von radioaktiven Vorläufern inhibiert wird.

In orientierenden Versuchen soll deshalb im nächsten Abschnitt untersucht werden, welche der diskutierten Wechselwirkungen wahrscheinlich sind.

3.3 Einige Experimente zur Natur der Flavonoid-Membran-Interaktion

Im vorausgegangenen Kapitel wurde gezeigt, daß höhere Konzentrationen ($> 20 \mu\text{M}$) der antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide bzw. Silibinin die Aufnahme von Precursoren für die DNA-, RNA- und Protein-Synthese sowie anderer niedermolekularer Stoffe hemmen. Eine Hypothese zur Erklärung dieses Membraneffekts auf molekularer Ebene wurde diskutiert: Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß die Testsubstanzen an Membrankomponenten binden und damit die Durchlässigkeit der Membran reduzieren.

Komponenten der biologischen Membranen sind Proteine (ca 60 % Trockengewicht), Lipide (ca 40 % Trockengewicht), Kohlenhydrate (1-10 % Trockengewicht) entweder als Glykolipide oder Glykoproteine (HARRISON & LUNT, 1980).

Es ist bekannt, daß Flavonoide eine deutliche Affinität zu Zellmembranen (TESI & FORSSMANN, 1971; RING et al., 1973; 1976; ROBINSON et al., 1979), mitochondrialen Membranen (FRITZ-NIGGLI, 1968; LANG & RACKER, 1974), bakteriellen Membranen (RING et al., 1973), lysosomalen Membranen (NIEBES & PONARD, 1975) sowie Kernmembranen (SONNENBICHLER et al., 1980) haben. Es wird behauptet, daß diese Wechselwirkung zwischen den Flavonoiden und den Membranen besonders mit ungesättigten Lipidkomponenten (RING et al., 1973) stattfindet. Abhängig von der Anzahl der OH-Gruppen, der Molekülgröße, der Molekülkonformation und der Flexibilität binden Polyphenole auch an Proteine (HASLAM & LILLEY, 1986). Diese Bindung kommt entweder durch Wasserstoff-Brückenbindungen bzw. hydrophobe Wechselwirkungen oder covalent durch die Reaktion über nukleophile Gruppen (z.B. -SH, -NH₂) der Proteine (HASLAM & LILLEY, 1986) zustande. Diese Polyphenol-Protein-Assoziation scheint ein relativ unspezifisches Phänomen zu sein (HASLAM & LILLEY, 1986). Als Bindungspartner der antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide bzw. Silibinin kommen also hauptsächlich die Lipide und die Proteine der Hepatozytenmembran in Frage. Um erste Einblicke in die Art der Wechselwirkung zu bekommen, wurde die Bindung der hier untersuchten Flavonoide an Membranlipide und an Membranproteine in Modellsystemen untersucht.

a) Das Liposomen-Modell :

Liposomen sind geschlossene vesikuläre Strukturen, die nach Hydratation von Phospholipiden in wässrigem Puffer spontan gebildet werden. Im Innenraum der mono- bzw. bimolekularen Lipidschichten ist wässriges Medium eingeschlossen. Bei den Versuchen, durch die eine Interaktion zwischen der Testsubstanz und den Membranlipiden untersucht werden sollte, wurden Liposomen aus Lecithin, einem Hauptmembranphospholipid der Ratten-Hepatozyten (SKIPSKI et al., 1965) präpariert. In den Innenraum der bilamellaren Liposomen

wurde im Verlauf der Liposomen-Formation ^3H -Inulin (Mr:5000) eingeschlossen. Durch charakteristische Detergensenkonzentrationen kann das eingeschlossene ^3H -Inulin wieder freigesetzt werden. Nach Pelletieren der intakten Liposomen kann die Radioaktivität des freigesetzten ^3H -Inulins im Überstand gemessen werden; sie stellt ein Maß für die vom Detergens verursachte Membranauflösung der Liposomen dar. Je nach Interaktionspotenz einer Substanz mit der Liposomenmembran wird die benötigte Detergensenkonzentration zur Auflösung der Liposomenmembran erhöht. Die ^3H -Inulinfreisetzung nach Zusatz der "kritischen Detergensenkonzentration" ohne Zugabe von Testsubstanz wurde gleich 100 % gesetzt.

b) Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Membranproteinen und den zu testenden Flavonoiden wurde beispielhaft der Einfluß der Verbindungen auf die Aktivität von ATPase aus Hepatozytenmembranen untersucht. Bei diesem Test mißt man die Freisetzung anorganischen Phosphates aus ATP. Storende Wechselwirkungen zwischen den zu testenden Substanzen und der ATPase macht sich in einer Reduzierung der Phosphat-Freisetzung bemerkbar.

3.3.1 ^3H -Inulinfreisetzung aus Liposomen durch Behandlung mit Na-Cholat in Gegenwart der Flavonoide

Wie vorausgehend skizziert, wurde der Einfluß von EA-3 und Silibinin auf die Liposomenstabilität getestet. In die Liposomen eingeschlossen wurde ^3H -Inulin. Die Zugabe der gelosten Testsubstanz erfolgte in DMSO/H₂O (1:1). Nach 10 minutiger Inkubation wurden verschiedene Na-Cholatkonzentrationen zu Aliquots zugesetzt, die Liposomen jeweils pelletiert und die Radioaktivität des freigesetzten ^3H -Inulins im Überstand bestimmt. Die benötigte Na-Cholatmenge zur Liposomenmembranauflösung kann als Indikator für eine Wechselwirkung zwischen Silibinin bzw. EA-3 und der Liposomenmembran gelten (Abb. 28).

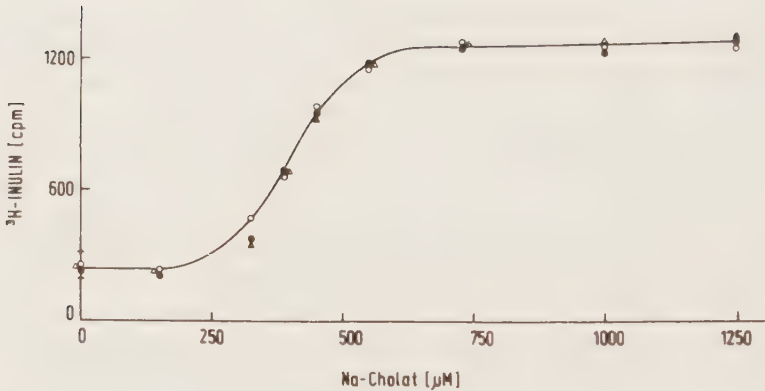


Abb. 28 ^3H -Inulinfreisetzung aus lecithinhaltigen Liposomen ohne ($\circ$), mit Einfluß von $9\mu\text{M}$ Silibinin ($\bullet$) und mit Einfluß von $900\mu\text{M}$ Silibinin ($\triangle$); Mittelwerte aus je 3 Messungen

Abb. 28 zeigt, daß die zur Auflösung der Membran notwendige Na-Cholatkonzentration bei den "Kontrolliposomen" und der mit niedrigen oder hohen Konzentrationen Silibinin behandelten Liposomen gleich groß ist. Es scheint, daß Silibinin die Stabilität der künstlichen Lipidmembran nicht beeinträchtigt.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, daß eine einflußnehmende Interaktion zwischen Silibinin und den Membranlipidkomponenten nur dann stattfinden kann, wenn das Flavonoid während der Formation in die Membran eingebaut wurde. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Gemisch aus Silibinin und Lecithin zur Herstellung der Liposomen verwendet und damit die Präparation von silibininhaltigen Liposomen (wie auf S.109 beschrieben) durchgeführt. In die

Liposomen wurde wieder ^3H -Inulin eingeschlossen. Die ^3H -Inulinfreisetzung mit verschiedenen Na-Cholatkonzentrationen ist in Abb. 29 dargestellt.

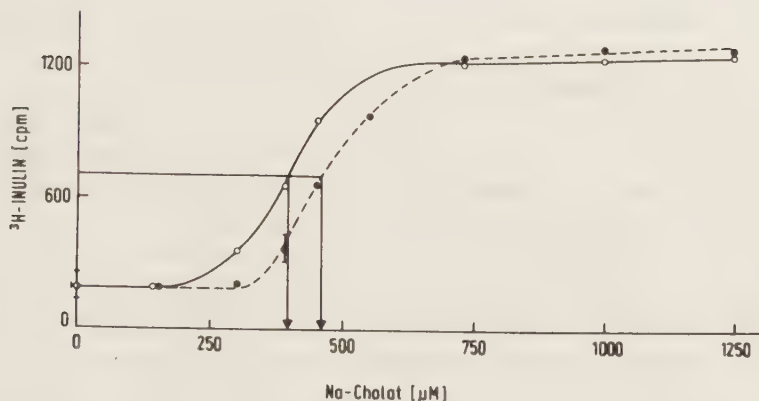


Abb. 29 ^3H -Inulinfreisetzung aus lecithinhaltigen Liposomen ohne (o) und im Gegenwart von eingebautem Silibinin (●); Mittelwerte aus je 3 Messungen

Man erkennt aus Abb. 29, daß Silibinin in diesem Versuchsansatz die Na-Cholatdosis, die für die Freisetzung des eingeschlossenen ^3H -Inulins notwendig ist, erhöht. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit EA-3 anstelle von Silibinin erhalten. Eine effiziente Wechselwirkung der Flavonoide mit Lipiden wird offensichtlich nur dann erreicht, wenn die Formierung der Lipidschichten bereits in Gegenwart der Flavonoide erfolgt ist. Es scheint, daß die Garcinia-Flavonoide bzw. Silibinin durch Interaktion mit Lipidkomponenten die Eigenschaften der Membran erst dann verändern können, wenn die Testsubstanz in die Membran aufgenommen wurde.

Dieses Ergebnis stimmt mit der von WISSEMAN (1978) berichteten Reduzierung der Oberflächenspannung von synthetischen monomolekularen Lipidschichten durch Silibinin überein.

3.3.2 Beeinflussung der Membran-ATPase-Aktivität durch das Garcinia-Flavonoid EA-3 und Silibinin

Wie einleitend erwähnt, ist eine überwiegend unspezifische Wechselwirkung zwischen Polyphenolen und Proteinen lange bekannt (HASLAM & LILLEY, 1986). Die integralen Membranproteine der Hepatozytenmembran sind hauptsächlich Lipoproteine und Glykoproteine, die zum Transport für diverse Substrate und für die strukturelle Integrität der Zellmembran verantwortlich sind (POPPER, 1976). Es ist denkbar, daß die Polyphenole Silibinin, wie auch die Garcinia-Flavonoide, an Membranproteine binden und damit deren Funktionen beeinträchtigen.

Eines der wichtigsten Transportproteine der Hepatozytenmembran ist die Na^+/K^+ -ATPase. Dieses Protein katalysiert die Hydrolyse von ca 20-40 % des ATP-Gehalts der Zelle pro Stunde, um drei intrazelluläre Na^+ gegen zwei extrazelluläre K^+ auszutauschen (GARRAHAN & GARAY, 1976). Es sind bereits Beispiele bekannt, in denen Flavonoide die Na^+/K^+ -Transport-ATPase hemmen z.B. bei der ATPase der Mitochondrien (SUOLINNA et al., 1975), sowie bei Chloroplasten (DETERS et al., 1975) u.a. Wir haben untersucht, ob auch die Garcinia-Biflavonoide bzw. Silibinin die Na^+/K^+ -ATPase der Hepatozytenmembran beeinflussen.

ATPase und 0.1 bzw. 1mM der zu testenden Substanz wurden dem Reaktionsgemisch zugesetzt, durch Zugabe von ATP-Na gestartet und das freigesetzte anorganische Phosphat im Überstand nach LANZETTA et al. (1979) bestimmt (s. experim. Teil, S.110). In Tab. 9 ist der experimentell meßbare Einfluß der untersuchten Flavonoiden auf die Aktivität der isolierten ATPase dargestellt.

Tab. 9 Einfluß des Garcinia-Flavonoids EA-3 bzw. Silibinin auf die Membran-ATPase-Aktivität

Substanz	Dosis(mM)	% Hemmung der ATPase-Aktivität
Kontrolle 1	0.1	0
	1.0	0
Kontrolle 2	-	0
EA-3	0.1	23.2
	1.0	56.9
Silibinin	0.1	17.5
	1.0	36.6

Kontrolle 1 : Reaktionsgemisch + ATP-Na + Testsubstanz

Kontrolle 2 : Reaktionsgemisch + ATPase + ATP-Na

Wie man aus Tab. 9 ersehen kann, hemmt EA-3 bzw. Silibinin die Membran-ATPase-Aktivität sehr deutlich. Bemerkenswert ist, daß der Hemmeffekt besonders bei hohen Konzentrationen von Testsubstanz feststellbar ist.

3.3.3 Zusammenfassung der Befunde zur Interaktion der Garcinia-Biflavonoide und von Silibinin mit Membrankomponenten

Die vorausgehenden Versuche haben gezeigt, daß die anti-hepatotoxischen Garcinia-Flavonoide und Silibinin in Konzentrationen $> 20 \mu\text{M}$ die Aufnahme von Precursormolekulan in die Hepatozyten hemmen. Eine der denkbaren Erklärungen war eine durch die Flavonoide bedingte Beeinflussung der Zellmembranen. Es war zu vermuten, daß die Flavonoide durch

eine Wechselwirkung mit Komponenten der Membran diese für die Permeation der untersuchten Stoffe blockieren.

Komponenten der biologischen Membranen sind hauptsächlich Proteine und Lipide (HARRISON & LUNT, 1980). Als Bindungspartner für die antihepatotoxischen Garcinia-Flavonoide bzw. Silibinin konnten also Lipide und Proteine der Hepatozytenmembran in Frage kommen.

Um erste Einblicke in mögliche Wechselwirkungen zu bekommen, wurde mit künstlich erzeugten Liposomen als Modellsystem untersucht, ob eine Affinität zwischen Silibinin bzw. EA-3 und den Lipiden besteht. Zwischen den zu testenden Substanzen und der künstlichen Lipidmembran konnte keine Interaktion nachgewiesen werden, wenn das Flavonoid dem Außenmedium zugesetzt wurde. Ein Effekt zeigte sich nur, wenn schon während der Liposomenpräparation die Flavonoide zugegen waren und so Bestandteile der "Membran" wurden. Die kritische Na-Cholatkonzentration zur Auflösung der Liposomen mußte in diesem Fall erhöht werden. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der von WISSEMAN (1978) berichteten Reduzierung der Oberflächenspannung von synthetischen monomolekularen Lipidschichten durch Silibinin überein.

Weitere Hauptkomponenten der Zellmembran sind Proteine. Als Beispiel für ein Membranprotein wurden Versuche mit der isolierten Na^+/K^+ -ATPase durchgeführt. Das Experiment zur Interaktion zwischen Silibinin bzw. EA-3 und isolierter Na^+/K^+ -ATPase, eines der wichtigsten Transportproteine der Hepatozytenmembran, zeigte, daß die Flavonoide diesen Enzymkomplex hemmen. Dies ist nicht überraschend, da bekannt ist, daß Flavonoide sehr leicht über -SH oder $-\text{NH}_2$ Gruppen an Proteine binden können (HASLAM & LILLEY, 1986). Eine Enzyminaktivierung ist in der Folge gut denkbar.

3.3.4 Nachweis der Bindung von Silibinin an Leberzellmembranen durch Autoradiographie

Um festzustellen, ob die Flavonoide tatsächlich auch in vivo an Strukturen der Zellmembran binden, wurde ^3H -Silibinin (Spez. Akt. 322 mCi/mmol) an Ratten i.p. injiziert, die Lebern nach 24 h entnommen und die Bindung von radioaktivem Silibinin an die Zellmembranen autoradiographisch nach SONNENBICHLER et al. (1980) bestimmt (Abb. 30).

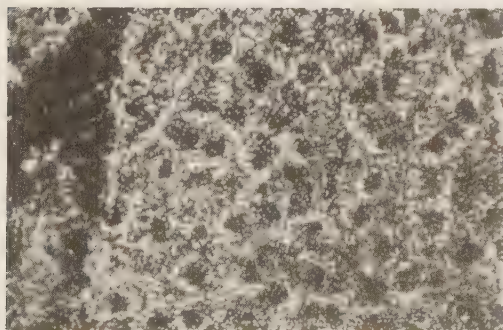


Abb. 30 Autoradiographie von Gefrierschnitten von Rattenlebern nach 8 Wochen Expositionszeit; 7.5 μCi ^3H -Silibinin wurden i.p. an Ratten appliziert. Nach 24 h wurde die Leber entnommen; Vergrößerung 1000 x

Wie Abb. 30 zeigt, findet sich viel Radioaktivität an die Membranen der Leberparenchymzellen gebunden. In früheren Versuchen von SONNENBICHLER et al. (1980) war gezeigt worden, daß nach 24 h noch ein großer Teil Silibinin unverändert in den Hepatozyten vorliegt. Man darf deshalb annehmen, daß die Radioaktivität die Silibininanreicherung

wiederspiegelt.

Ein Teil des gebundenen Silibinin konnte nicht mehr mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Vermutlich liegt eine starke Wechselwirkung zwischen Flavonoid und den Komponenten der Zellmembran vor. Als Konsequenz tritt eine Hemmung der Aufnahme kleiner Moleküle in die Zelle auf, die im Fall von Precursoren (Uridin, Methionin, Thymidin) eine geringere Syntheserate von Makromolekülen vortauscht und die im Fall der Intoxikation mit GalN und CCl₄ eine Schutzwirkung bedeutet, da die Toxikons in die Hepatozyten nur mehr beschränkt aufgenommen werden. Diese Feststellung mag auch die Erklärung geben für die pharmakologisch und klinisch so bedeutsame Beobachtung, daß Silibinin sehr wirksam bei Knollenblätterpilzvergiftung eingesetzt werden kann.

Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (WEIL & FRIMMER, 1970; FRIMMER & KROKER, 1975; FAULSTICH et al., 1980; VALENZUELA et al., 1985; PARADISI et al., 1977; ANTWEILER, 1977; WISSEMAN, 1978; PARASASSI et al., 1984; SEEGER, 1971; RAMELLINI & MELDOLESI, 1974; 1976) zur protektiven Wirkung von Silibinin gegen die Amatoxine. Im Fall der Knollenblätterpilzvergiftung wird noch zusätzlich die von SONNENBICHLER et al. (1976; 1986) nachgewiesene Erhöhung der rRNA-, Ribosomen- und Proteinsynthese positiv wirksam und damit die Regenerationspotenz der Leberzellen erhöht.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Materialien

Altromin 1324, Fa. Altromin, Lage

^3H - α -Aminoisobutyrat, NEN, Dreieich

α -Amanitin, Madaus, Köln

Aquasol-2, NEN, Dreieich

Calciumchlorid ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), NEN, Dreieich

Cholat, Sigma, Deisenhofen

Dextran T 70, Pharmacia AB, Uppsala

Dithioerythritol, Sigma, Deisenhofen

Dithioerythrit, Serva, Heidelberg

EDTA (Titriplex III), Merck, Darmstadt

EGTA, Ciba-Geigy AG, Basel

^3H -Estradiol, NEN, Dreieich

Ethylenglycolmonomethylether, Merck, Darmstadt

Falcon-Kulturflaschen, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

^3H -Galactosamin, NEN, Dreieich

β -Glucuronidase, Sigma, Deisenhofen

Glycylglycin Puffer, Sigma, Deisenhofen

Heparin, Novo-Industrie, Mainz

Hepes, Serva, Heidelberg

Hexobarbital-Natrium (Evipan-Na[®]), Sigma, Deisenhofen

^3H -Inulin, NEN, Dreieich

Kalberserum foetales, Biochrom, Berlin

Kieselgel 60, Korngroße < 0.063 nm, Merck, Darmstadt
 Kieselgel 60F₂₅₄-Fertigplatten, Merck, Darmstadt
 Kollagenase, Worthington, New Jersey

³H-Leucin, NEN, Dreieich
 L-α -Lecithin, Typ. III B, Sigma, Deisenhofen

Malachitgrün-HCl, Janseen Chemica, Beerse
 Medium RPMI-1640, Biochrom, Berlin
 Membranfilter, Dianorm, München
³⁵S-Methionin, NEN, Dreieich
 Mini-Lipoprep Gerät, Dianorm, München

Nacoren, Iffa Merieux, Laupheim
 Nonanoyl-N-Methylgluconamid, OxyL, Bobingen
 Norit a, Sigma, Deisenhofen
 Nusse der Garcinia kola-HECKEL, Nigeria
 Nitrocellulosefilter, Sartorius, Göttingen

Penicillin G, Biochrom, Berlin
 Phenylquecksilberacetat, Sigma, Taufkirchen
 Pipes-Tris-Puffer, Sigma, Deisenhofen
 PMSF, Merck, Darmstadt

Sephadex 4 B, Pharmacia AB
 Silibinin, Madaus, Köln
 Silibinin-2',3-dihydrogensuccinat, Na-Salz, Madaus, Köln
 Sterox, Baker Chemicals, Deventer
 Streptomycin, Biochrom, Berlin
 Surfyndol, Serva, Heidelberg

³H-Thymidin, Amersham-Buchler, Braunschweig
 Trypanblau, Serva, Heidelberg

³H-Uridin, NEN, Dreieich
³H-UTP, NEN, Dreieich

2. Methoden

2.1 Chemische Methoden zur Isolierung der Verbindungen aus *Garcinia kola* Nüssen

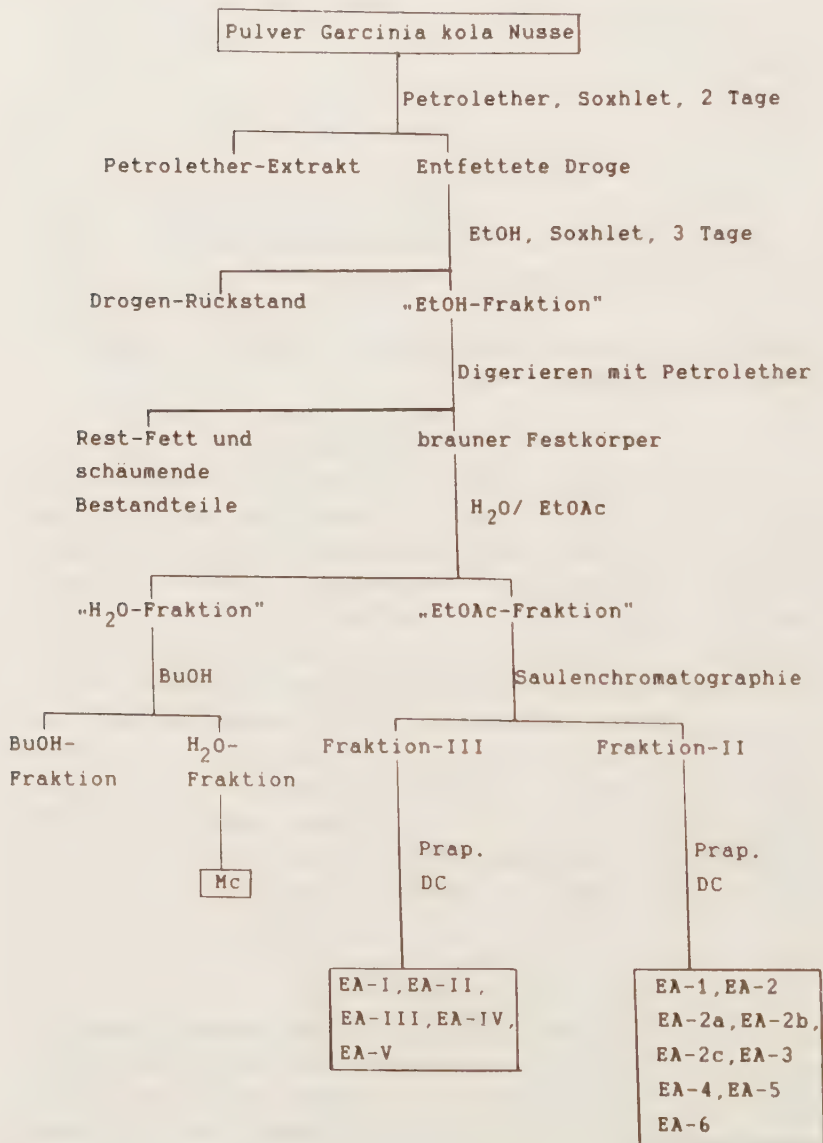
Die Bearbeitung der *G. kola* Nüssen erfolgte nach dem auf S.92 angegebenen Schema II.

2.1.1 Extraktion der *Garcinia kola* Nüsse

Die *Garcinia kola*-HECKEL Nüsse wurden an der Luft getrocknet bis die braunen Schalen entfernt werden konnten. Nun wurden 1 kg Nüsse im Starmix fein zerkleinert und gesiebt. Hierauf wurde das Drogenpulver im Soxhlet 2 Tage lang mit Petrolether (40-60 °C) extrahiert, wobei besonders das ölreiche Endosperm der Nüsse weitgehend entfettet werden konnte. Der Petroletherextrakt wurde verworfen, und die entfettete Droge an der Luft vollständig getrocknet. Anschließend wurde das Drogenpulver im Soxhlet 3 Tage mit 70% Ethanol extrahiert. Nach Einengen der ethanolischen Lösung am Rotationsverdampfer bei 40 °C blieb 158 g brauner öliger Extrakt zurück (= 7,9 % Ausbeute).

2.1.2 Fraktionierung der EtOH-Fraktion

Die EtOH-Fraktion wurde mehrmals zur Entfernung restlichen Fetts mit je 250 ml Petrolether digeriert. Der nunmehr vollkommen fettfreie braune Rückstand wurde in bidest. Wasser suspendiert und anschließend dreimal mit Ethylacetat (EtOAc) ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase

Schema II : Isolierung der *Garcinia kola* Nuß Verbindungen

mit Na_2SO_4 wurden diese im Vakuum vollständig eingeeengt. Die Ausbeute betrug 40 g Substanz (= 25.3 % der EtOH-Fraktion). Die wäßrige Phase wurde nach der EtOAc-Extraktion dreimal mit n-Butanol (BuOH) ausgeschüttelt, die vereinigten BuOH-Phasen mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bei 40 °C zur Trockene gebracht. Die Ausbeute betrug 5.8 g an gelber pulvriger Substanz (= 3.7 % der EtOH-Fraktion). Die wäßrige Phase der BuOH-Ausschüttelung wurde ebenfalls vollständig bei 40 °C eingeeengt und der zurückbleibende schmierige Rückstand (110 g, 69.6 % der EtOH-Fraktion) 1-2 Monate im Kuhlsschrank bei 4 °C stehengelassen. Nach dieser Zeit erhält man weiße rhombusförmige Kristalle, deren Masse nach dreimaligem Waschen mit Methanol 95 g betrug (= 60 % der EtOH-Fraktion). Diese Kristalle wurden als Mc bezeichnet.

2.1.3 Säulenchromatographie der EtOAc-Fraktion

Kieselgel 60 (Fa. Merck) wurde mit dem Laufmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (14:9:4) zu einer homogenen Suspension angerührt und in eine Glassäule (Durchmesser 5 cm, Länge 60 cm, Adsorbensmenge 500 g) eingegossen. Der zu trennende Extrakt (1-4 % des Kieselgelgewichts) wurde mit wenig Kieselgel angerieben, auf die Säule aufgetragen. Als Elutionsmittel dienten stufenweise :

LM 1 Dichlormethan:Methanol:Wasser (14:9:4)

LM 2 Chloroform:Methanol:Wasser (64:50:10)

LM 3 Methanol:Wasser (1:1)

LM 4 Methanol

LM 5 Wasser

Die Tropfgeschwindigkeit betrug ca 40-50 Tr./min. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler in Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen, Fraktionen mit gleichem DC-Bild vereinigt und im Vakuum bei 40 °C eingeeengt. Es ergab sich :

Fraktion I : Gemisch, das keine der Banden 1, 2 und 3 (siehe Abb. 4, S.13) enthielt, ca 27 mg

Fraktion II : Gemisch, das die Banden 2 und 3 enthielt, ca 600 mg

Fraktion III : Gemisch, das die Bande 1 enthielt, ca 58 mg

2.1.4 Präparative Dünnschichtchromatographie

Isolierung von EA-1, EA-2, EA-2a, EA-2b, EA-2c, EA-3, EA-4, EA-5, EA-6

Die Fraktion II aus der Säulenchromatographie wurde in Methanol aufgenommen und bandförmig auf 0.5 mm-Kieselgelplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20 cm Fa. Merck) aufgetragen (Auftragmenge: 4 mg/Platte). Die Platten wurden zunächst im CHCl₃:Aceton:HCOOH (9:2:1) bis zu einer Laufhöhe von 5 cm und anschließend im selben Laufmittel dreimal stufenförmig bis 6.5 cm, 8.5 cm und 10 cm entwickelt. Nach jedem Durchgang wurde das Fließmittel kalt abgefohnt. Die aufgetrennten Banden wurden im UV bei 254 bzw. 365 nm detektiert. Die gekennzeichneten Flächen wurden ausgekratzt und die Substanzen dreimal 20 min lang mit Aceton p.a. eluiert und durch eine Glasfritte G 4 filtriert. Durch Membranfiltration erfolgte die Entfernung von Kieselgelverunreinigungen (Typ SM, Porengroße 0.45 µm, Fa. Sartorius). Nach Einengen der Lösung wurde erhalten : 5 mg EA-1, 260 mg EA-2, 2,2 mg EA-2a, 2.5 mg EA-2b, 1.5 mg EA-2c, 440 mg EA-3, 10 mg EA-4, 5.6 mg EA-5 und 4 mg EA-6. Ein anschließendes Auswaschen des Kieselgels mit dem polareren Gemisch Aceton:MeOH (1:1) erhöhte die Ausbeute der isolierten Verbindungen nicht.

Orientierende Massenspektroskopie deutete darauf hin, daß die isolierten Verbindungen noch unverdampfbare Substanzen, vermutlich Kieselgel, enthielten. Jede Verbindung wurde

deshalb in EtOAc gelöst und mit 1 %iger HCl ausgeschüttelt. Die EtOAc-Phase wurde im Vakuum 72 h über P_2O_5 /KOH von den Lösungsmitteln vollständig befreit. Auf diese Weise fielen an : 3.2 mg EA-1, 100 mg EA-2, 0.2 mg EA-2a, 1.7 mg EA-2b, 0.4 mg EA-2c, 260 mg EA-3, 8.6 mg EA-4, 3.9 mg EA-5 und 2.2 mg EA-6.

Isolierung von EA-I, EA-II, EA-III, EA-IV und EA-V

Auf gleiche Weise wurden aus Fraktion III nach Auftrennung über Kieselgel-Platten und Elution mit Aceton:MeOH (5:1) folgende Verbindungen isoliert : 1.1 mg EA-I, 7 mg EA-II, 12.7 mg EA-III, 2.6 mg EA-IV und 7.7 mg EA-V.

Die Detektion der Verbindungen erfolgte wieder im UV bei 254 nm, wobei jede Bande eine mehr oder weniger starke Fluoreszenzminderung ergibt und im UV 365 nm nach Besprühen mit Naturstoff (NST)/PEG-Reagenz sichtbar wird. Im letztgenannten Fall werden die Platten nacheinander mit einer Lösung von Diphenylborsäure- β -aminoethylester (NST, 1 % in MeOH) und Polyethylenglycol 4000 (PEG, 5 % in EtOH) besprüht und im Vis sowie im UV bei 365 nm ausgewertet.

2.2 Physikalische Untersuchungsmethoden

2.2.1 Methoden

Die UV-Spektren wurden in methanolischer Lösung mit dem UV/VIS-Spektrophotometer Lambda 5 der Fa. Perkin-Elmer gemessen (Schichtdicke 1 cm). Die Konzentration betrug i.a. 25 μ g/ml MeOH.

Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgte mit dem Jobin-Yvon Autoradiograph Mark IV (Schichtdicke 0.1 cm). Die Konzentration betrug i.a. 0.2 mM. Als Lösungsmittel diente Methanol

in ChromAR-Qualität der Fa. Promochem, Wesel.

IR-Spektren : Die Substanzen wurden in Kaliumbromid gepreßt und die Spektren mit dem AccuLab-1 Spektrophotometer der Fa. Beckmann aufgenommen. Die Konzentration betrug i.a. 1 mg/100 mg KBr.

Die Messung der Massenspektren erfolgte mit dem Spektrometer CH 7A der Fa. Varian MAT GmbH (Finnigan MAT GmbH).

Die NMR-Spektren (500 MHz) wurden mit einem AM 500 NMR-Spektrometer der Fa. Bruker aufgenommen. Die H/H-Korrelationspektren wurden mit der Jeener-Sequenz (Cosy) aufgenommen.

2.2.2 Physikalische Daten von EA-3

Schmp. 200 - 202 °C

R_f (DC) : 0.49 (LM : CHCl₃-MeOH, 4 : 1)

MS : (4 kV, 70 eV, 300 µA, ST 300 °C, 10⁻⁶ Torr) :

m/e (rel. Int. %) = 558 (1.12), 540 (0.99), 432 (5.96), 414 (6.29), 297 (26.8), 270 (9.9), 126 (100), 107 (50);

NMR : (500 MHz, d₆-DMSO, d₆-DMSO + D₂O, TMS int.) :

(s. Abb. 7, S.23 und Tab. 4, S.24)

IR (KBr) : ν_{max} (cm⁻¹) = 3362 (br, OH), 1690, 1630 (C=O), 1515 (arom.), 1450, 1360, 1250, 1155, 1080, 1040, 945, 830;

UV (MeOH) : λ_{max} (nm) = 293.1 (ε = 29329), 328 (sh); (+ AlCl₃): 333, 283 sh; (+ NaOAc) : 338, 283 sh;

CD (MeOH, 0.2 mM, d = 0.1 cm)

λ_{max} (Δε)(nm) = 339 (+2.1), 302 (-9.3), 276 (+12.5), 245 (-1.6), 233 (+6.4), 222 (-11.1), 213 (-20.5);

2.2.3 Physikalische Daten von EA-2

Schmp. 217 - 220 °C

R_f (DC) : 0.4 (LM : CHCl₃-MeOH, 4 : 1)

MS : (4 kV, 70 eV, 300 μA, ST 300 °C, 10⁻⁶ Torr) :

m/e (rel.Int. %) = 574 (< 1), 556 (0.99), 448 (5.56), 430 (17.88), 310 (11.92), 297 (39.07), 270 (11.26), 209 (6.62), 127 (39.4), 126 (100), 123 (59.27), 107 (29.14);

NMR : (500 MHz, d₆-DMSO, d₆-DMSO + D₂O, TMS int.) :

(s. Tab. 5, S.26)

IR (KBr) : ν_{max} (cm⁻¹) = 3340 (br, OH), 1630 (C=O), 1520 (arom.), 1450, 1365, 1220, 1185, 1160, 840;

UV (MeOH) : λ_{max} (nm) = 291.6 (ε = 27759), 329 (sh); (+ AlCl₃) : 312; 288 sh; (+ NaOAc) : 333, 287 sh;

CD (MeOH, 0.2 mM, d = 0.1 cm)

λ_{max} (Δε)(nm) = 338 (+1.3), 305 (-6.9), 280 (+17.4), 245 (-2.6), 232 (+2.9), 215 (-16.1);

2.3 Biologische und biochemische Experimente

2.3.1 Schlafzeitbeeinflussung bei den in vivo mit CCl₄-geschädigten Ratten

Männliche Wistar-Ratten (150-200 g) erhielten per os 5 Tage lang zweimal täglich je 100 mg/kg der zu testenden Substanz in physiol. NaCl-Lösung mit 1 % Tween 60. Für jede der zu testenden Substanzen wurden 10 Tiere eingesetzt. Am 4. Behandlungstag erhielt jede Ratte 1 h nach der letzten Applikation 0.15 ml/kg CCl₄ (per os) in einer Mischung von 1:9 mit reinem flüssigen Paraffin. Die CCl₄-Dosis wurde so gewählt, daß die danach auftretenden histologischen Veränderungen der Leber einer diffusen Hepatitis weitgehend ähnelt. Nach 24 h erhielt jede Ratte eine Hexobarbital-Natrium-Lösung (Evipan-Na[®], 120 mg/kg, i.p.) injiziert. Als

Kriterium für die Schlafdauer galt die Zeit vom Ende der Hexobarbital-Injektion bis zum ersten Aufrichten und motorisch koordiniertem Vorwärtsbewegen der Tiere. Die Ratten schlafen ca 2 min nach Injektion des Barbiturats ein. Die Aufwachzeiten wurden mit denen jener Tiere verglichen, die mit CCl_4 in flüssigem Paraffin allein bzw. mit physiol. NaCl -Lösung, reinem flüssigem Paraffin und Tween-60-Lösung behandelt worden waren.

2.3.2 Isolierung und Kultur von Hepatozyten aus Ratten bzw. Mäusen

Die Präparation von Leberparenchymzellen wurde nach einer modifizierten Methode von SEGLEN (1973, 1976) durchgeführt : Den Wistar-Ratten (120-180 g) bzw. Swiss-Mäusen (37-40 g), die durch Ethernarkose ruhiggestellt waren, wurde i.p. Narcoren® (0.31 ml/kg) und zugleich Heparin (5000 I.E./kg) gespritzt. Für die chirurgischen Operationen ist die Sterilität aller Gefäße, Pipetten, Bestecke und sonstiger Hilfsmittel Voraussetzung (GREENE, 1935). Die Glasgefäße, mit denen die Hepatozyten in Berührung kamen, wurden silikonisiert. Als Arbeitsplatz diente eine sterile Werkbank.

Notwendige Lösungen :

a) Vorperfusionslösung (HANKS & WALLACE, 1949)

8.3 g/l NaCl , 0.5 g/l KCl , 2.4 g/l HEPES und 5.5 ml/l 1 M NaOH wurden in Aqua bidest. gelöst und bei 4 °C aufbewahrt. Die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Vorperfusionslösung (200 ml) enthielt zusätzlich 0.2 % Rinderserumalbumin (HOLLER & BRAUER, 1974), 0.5 mM EGTA, 100 µg Streptomycin/ml, 100 Einheiten Penicillin G/ml, wurde auf pH 7.45 eingestellt, durch Milliporefilter (Porengroße 22 µm/Durchmesser 45 mm) steril filtriert, O_2 -gesättigt und wurde dann im Wasserbad auf 39 °C erwärmt.

b) Enzympertusionslösung

Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Hank's-Lösung (180 ml) wurde mit Kollagenase II (1.0 mg/ml, IUB Nr.3.4.4.19), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4 mM), Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Penicillin G (100 I.E./ml) versetzt. Die Lösung wurde auf pH 7.5 eingestellt, durch Milliporefilter (Porengröße 0.45 μm /Durchmesser 45 mm) steril filtriert, O_2 -gesättigt und auf 39 °C erwärmt.

c) Kulturmedium

Das Kulturmedium bestand aus 10.40 g Medium RPMI-1640 (Fa. Biochrom, Berlin) mit 50 mg L-Leucin und 2 g NaHCO_3 . Das Gemisch wurde in Aqua bidest. (1 l) gelöst, auf pH 7.6 eingestellt, durch Milliporefilter (Porengröße 0.22 μm /Durchmesser 45 mm) steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Bevor das Medium (70 ml) zur Reinigung und Kultur der isolierten Hepatozyten eingesetzt worden war, erhielt es Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Penicillin G (100 I.E./ml) und wurde anschließend auf 37 °C erwärmt.

d) Silikonisierung von Glasgefäßen

Nach einer modifizierten Methode von BRYANT et al.(1961) wurde die Innenwand der Glasgefäße, mit denen die Hepatozyten in Berührung kommen sollten, silikonisiert. Man füllt die Gläser mit einer 10 % igen Polydimethylsiloxan (Silikonol, Roth, Karlsruhe)-Lösung in CHCl_3 , entleert sie, läßt 15 min abtropfen, trocknet 30 min bei 85 °C, erhitzt 3 h auf 250 °C, kühlt 20 min, füllt mit warmen Aqua bidest., läßt 2 h stehen, spült zweimal mit bidest. Wasser, trocknet bei 100 °C und sterilisiert dann im Autoklaven.

e) Präparation der Hepatozyten

Der Bauch der Tiere wurde mit 70 % Ethanol gereinigt. Nach öffnen des Peritoneums wurde die bis zum Diaphragma abgeschnittene Hautschicht gehoben, die frei gelegte Vena cava inferior abgeklemmt, eine Einmal-Kanüle (Nr.14 bei

Ratten und Nr.18 bei Mäusen) eingeführt, bis die Kanülen-Spitze etwa 1 cm in die Vena portae eingelegt ist. Danach wurde die Vena portae abgeklemmt. über die Vena portae wurde dann die Vorperfusionslösung (etwa 7.5 ml/min bei Ratten und 2 ml/min bei Mäusen) in die Leber gepumpt. Gleichzeitig wurde die Aorta dorsalis durchgetrennt und die iliacalen Blutgefäße durchschnitten (WAGLE & INGEBRETSEN, 1973).

Die Vorperfusionslösung war auf 37 °C erwärmt, O₂-gesättigt bei pH 7.45 und enthielt 100 µg Streptomycin/ml, 100 E.I. Penicillin G/ml, 0.2 % BSA und 0.5 mM EGTA. Die Vorperfusionslösung muß Ca²⁺-frei sein, um von den Desmosomen alle Calcium-Ionen zu entfernen und dadurch die Auflösung der intrazellularen Kontakte zu erreichen (SEGLEN, 1976). Die Lösung wurde solange (ca 10 sec) in die Leber gepumpt bis eine Schwellung sichtbar wurde, dann wurde über der linken Herzvorkammer eine weitere Teflonkanüle in die Vena cava inferior eingeführt, die Vena cava inferior abgeklemmt und die Perfusion bis zur vollständigen Blutleere der Leber weitergeführt (ca 1 min). Die Pumpe wurde kurz (20 sec) abgeschaltet, die O₂- und Perfusionsschlauche sofort in einer Ca²⁺-, Mg²⁺-, EGTA- und Albumin-freien Hank's-Lösung gewaschen, die "Enzymperfusionslösung" angeschlossen und die Pumpe wieder eingeschaltet. Die Enzymperfusionslösung war wie oben mit O₂ gesättigt, auf 37 °C erwärmt und enthielt die erwähnten Antibiotika. Da Kollagenase ein Ca²⁺-abhängiges Enzym ist, war es wichtig, bei diesem Schritt wieder Ca²⁺ zuzufügen. Die Enzymperfusionslösung darf weiterhin keine Mg²⁺-Ionen enthalten, welche als Ca²⁺-Antagonisten agieren konnten. Diese Lösung wurde dann 10 min (9 ml/min bei Ratten und 2 ml/min bei Mäusen) durch die Vena portae in die Leber gepumpt.

Anschließend wurde die Leber von Bindegewebe befreit, in ein dieselbe Enzymlösung (40 ml, auf 37 °C erwärmt) enthaltendes Becherglas transferiert und 2 min bei 37 °C durch Schwenken bewegt. Anschließend wurde das Lebergewebe durch Einstechen

der Kanüle an verschiedenen Stellen bei laufender Pumpe aufgelockert, mit einer feinen Pinzette zerrupft und durch schwaches Reiben durch ein Stahlsieb das Leberzellhomogenat erhalten. Diese Zellsuspension wurde dann durch vier Lagen steriler Gaze in Zentrifugengefäße filtriert, die Gaze mit Enzymperusionslösung (10 ml) gewaschen und das Filtrat bei 4 °C 1 min mit 50 x g zentrifugiert. Das Hepatozytenpellet wurde anschließend 2 x mit Medium RPMI-1640 (je 40 ml) gewaschen.

Die Anzahl vitaler Zellen wurde durch Trypanblaufärbung bestimmt (HOWARD & PESCH, 1968; SEGLEN, 1973). Dafür wurden 10 µl Zellsuspension 1:100 mit Medium verdünnt und in der Zahlkammer ausgezählt. 50 µl der verdünnten Zellsuspension wurden mit 50 µl isotonischer 0,4 %iger Trypanblaulösung (400 mg Trypanblau + 850 mg NaCl + 2 ml 1 M HEPES in 100 ml Aqua bidest.) angefarbt (Farbekonzentration 0,20 %). Nach 5 min ließ man die so behandelten Zellen in eine Zahlkammer einlaufen. Im Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung kann der Anteil blau angefarbter Zellen von den farblosen intakten, vitalen Zellen unterschieden und ausgezählt werden.

Die oben angeführte Methode ergab Ausbeuten vitaler Hepatozyten von 90-96 % ($0,22-1,28 \times 10^6$ Zellen/ml). Anschließend wurden die Hepatozyten in Medium RPMI 1640 in einer Konzentration von ca $0,39 \times 10^6$ Zellen/ml Medium in Falcon-Plastik-Petrischalen (35 mm Durchmesser) pipettiert und bei 37 °C in 95 % O₂ + 5 % CO₂ haltiger feuchter Atmosphäre kultiviert (MORGAN et al., 1950). Auf die Zugabe von fetalem Kälberserum wurde verzichtet, dafür aber 2 mM Glutamin und 0,35 g NaHCO₃/l zugesetzt (WAYMOUTH, 1953).

2.3.3 In-vitro-Test auf Leberschutzwirkung nach CCl_4 - und GalN-Schädigung

Die folgenden Experimente wurden mit Hepatozyten (0.2 ml/Ansatz , $5.0 \times 10^6 \text{ Zellen/ml}$) aus jeweils drei verschiedenen Rattenlebern durchgeführt und Mittelwerte errechnet. Die durchschnittliche Abweichung der einzelnen Meßdaten lag unter 10 %.

a) Bestimmung der durch CCl_4 induzierten Zellschädigung nach KISO et al. (1983a)

Nach 24-stündiger Präinkubation bei 37°C in Medium RPMI-1640 wurden pro Ansatz 1×10^6 Hepatozyten in jeweils 1 ml Medium gebracht, das 10 mM CCl_4 in 0.01 ml Ethanol und die zu testende Substanz (oder den Extrakt) in 0.01 ml DMSO enthielt. Nach 60 min wurde der GPT-Spiegel im Medium nach KARMEN et al. (1955) gemessen. Dazu wurde 0.5 ml zu testendes Medium dem Reaktionsgemisch (0.2 M L-Alanin + 1 mg/ml NADH + 50 $\mu\text{g/ml}$ LDH + 0.1 M α -Ketoglutarat in 2.5 ml 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.4) zugesetzt und die Extinktionsänderung bei 340 nm ($d=1\text{cm}$) und 25°C 5 Minuten lang verfolgt.

b) Bestimmung der durch Galactosamin induzierten Zellschädigung nach KISO et al. (1983b)

0.4 mM GalN wurde in 1.0 ml Medium gelöst, dem die zu testende Substanz (oder der Extrakt) in 0.01 ml DMSO zugegeben wurde. Nach 1.5-stündiger Präinkubation bei 37°C in RPMI-1640 Medium wurden die Hepatozyten in das sowohl GalN als auch Testsubstanz enthaltende Medium umgesetzt. Nach 30 h wurde wie oben beschrieben die GPT-Aktivität im Medium bestimmt.

c) Bestimmung des Einflusses von Testsubstanzen auf eine definierte GPT-Aktivität im Medium ohne Zellen

0.2 mg Testsubstanz wurden in 2.0 μl DMSO gelöst und mit 200 μl Kulturmedium verdünnt, dem ein GPT enthaltendes Standardserum (2440 U/l, 50 μl) zugefügt war. Nach 30 min Stehenlassen bei 37°C erfolgte die Bestimmung der

jeweiligen GPT-Aktivitäten.

2.3.4 Messung der Protein-Synthese in isolierten Hepatozyten

Die Hepatozytensuspension (5.0×10^6 Zellen/ml) wurde 30 min bei 37°C unter 95 % O_2 + 5 % CO_2 und in feuchter Atmosphäre vorinkubiert (SCHREIBER & SCHREIBER, 1973). Anschließend wurde entweder ^3S -Methionin (2 $\mu\text{Ci/ml}$; Spez. Akt. 104.4 mCi/mmol) oder ^3C -Leucin (2 $\mu\text{Ci/ml}$; Spez. Akt. 356 mCi/mmol) zu der Zellsuspension gegeben und (je 3 ml) in sterilen Petrischalen gleichmäßig verteilt. Gleichzeitig wurde die in $\text{DMSO:H}_2\text{O}$ (1:1) bzw. H_2O (20 μl) aufgelöste Testsubstanz jedem Inkubationsgemisch zugesetzt. Die Kontrollen enthielten nur 20 μl des jeweiligen Lösungsmittels.

Nach verschiedenen Zeitabständen (0-8 h, Zeitabhängigkeit) oder nach 4 Stunden (Dosisabhängigkeit) wurden jeweils 250 μl Proben entnommen, mit eiskaltem Medium RPMI-1640 (250 μl) gewaschen und bei 4°C 1 min lang abzentrifugiert (Minifuge, 1000 U/min). Zum Pellet wurde 5 ml eiskalte 10 %ige TCA + 0.02 M TNPP-Lösung gegeben. Dem Fällungsansatz wurden 200 μl kalte L-Methioninlösung bzw. L-Leucinlösung (36 mg/20 ml HEPES Puffer, pH 7.6) zugegeben. Nachdem die Proben 30 min auf Eis standen und dann in heißem Wasser (95°C) 10 min erhitzt worden waren, wurden sie über Nitrocellulose (Porengröße 0.45 μ) abgesaugt. Die Filter wurden mit je 25 ml 10 % und dann 5 %iger TCA (beide mit 0.02 M TNPP) gewaschen, 30 min bei 60°C getrocknet, in Cellosolve (1 ml) und Aquasol-2 (10 ml) aufgelöst, 20 min kraftig geschüttelt (Gyratory Shaker, New Brunswick Scientific Co., 400 RPM) und die Radioaktivität in einem Packard-Szintillationszähler gezählt. Jeder der in den abgebildeten Kurven angegebene Punkt ist der Mittelwert aus 3 Bestimmungen.

2.3.5 Messung der RNA-Synthese in isolierten Hepatozyten
 Hepatozytensuspension (5.0×10^6 Zellen /ml) wurde 30 min bei 37°C unter $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ in feuchter Atmosphäre vorinkubiert. Anschließend wurde ^3H -Uridin ($2 \mu\text{Ci/ml}$; Spez. Akt. 26.3 Ci/mmol) zu der Suspension gegeben. Nach der Aufteilung des Inkubationszusatzes in 3 ml Proben wurde die Testsubstanz, die durch Auflösen in Aqua bidest bzw. in einem $\text{DMSO:H}_2\text{O}$ (1:1)-Gemisch in Lösung gebracht wurde, den Proben zugesetzt. Die Kontrollen enthielten nur $20 \mu\text{l}$ des entsprechenden Lösungsmittels. Nach verschiedenen Zeiten (0-4 h, Zeitabhängigkeit) bzw. nach 2 h (Dosisabhängigkeit) wurden jeweils $250 \mu\text{l}$ Probe entnommen und in 5 ml eiskalte 10% ige TCA + 0.02 M TNPP pipettiert. Die Gemische wurden ca 30 min auf Eis stehengelassen, über Nitrocellulose abfiltriert und dann die Filter wie oben beschrieben weiter behandelt. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 3 Messungen.

2.3.6 Isolierung und Reinigung von Zellkernen aus Rattenleber

Ratten wurden durch überlange Ethernarkose getötet, die Lebern entnommen und in kalter 0.9% NaCl-Lösung gewaschen. Alle weiteren Operationen wurden bei 4°C durchgeführt. Je eine Leber wurde in 60 ml 0.32 M Sucrose, 2mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl, pH 7.0 mit einem motorgetriebenen Glas-Teflon-Homogenisator suspendiert ($2 \times 2500 \text{ UpM}$, $3 \times 5000 \text{ UpM}$), durch 4 Lagen Gaze filtriert und 15 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 20 ml 2.2 M Sucrose, 1mM MgCl_2 , 10mM Tris-HCl, pH 7.0 aufgenommen, im Handhomogenisator 3 mal homogenisiert und in Zentrifugenbecher geschichtet, die unten bereits zu $1/5$ mit gleichem Puffer gefüllt waren. Die anschließende Zentrifugation erfolgte 90 min bei $40000 \times g$ in einer TGA-50 Ultrazentrifuge (Fa. Kontron). Die weißen Kernpellets wurden in "Einfrierpuffer" nach FODOR u. DOTY (1977), bestehend aus 25% Glycerin, 5mM MgCl_2 , 10mM Tris, 0.2mM EDTA, 5mM DTE, pH 7.5 mit dem Hand-

homogenisator suspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.7 Messung der RNA-Synthese in isolierten Zellkernen

Pro Einzeltest wurden 2×10^6 Kerne eingesetzt, die in $100 \mu\text{l}$ folgender Lösung suspendiert waren :

125 mM NaCl , 3 mM MgCl_2 , 3 mM DTE , 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 2 mM MnCl_2 , 0.6 mM ATP , 0.6 mM GTP , 0.6 mM CTP , 0.015 mM UTP (nicht radioaktiv) und $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-UTP}$ (Spez. Akt. 37 Ci/mmol). Die zu testende Substanz wurde in der Regel in $\text{DMSO/H}_2\text{O}$ (1:1) gelöst, wobei die Kontrollwerte stets die gleiche Menge $\text{DMSO/H}_2\text{O}$ enthielten. Nach unterschiedlicher Inkubationszeit bei 37°C (0–30 min; Zeitabhängigkeit) bzw. nach 15 min (Dosisabhängigkeit) wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen, $50 \mu\text{l}$ "RNA-Lösung" ($3 \text{ mg/ml RNA} + 0.01\% \text{ Phenylquecksilberacetat} + 1 \text{ mM PMSF}$) dazupipettiert und die Reaktion durch Zugabe von eiskalter $10\% \text{ TCA} + 0.02 \text{ M TNPP}$ gestoppt. Nachdem die Proben mindestens 15 min in Eis standen, wurde über Nitrocellulosefilter abgesaugt. Die Filter wurden mit je $25 \text{ ml } 10\%$ und 5% (beide mit 0.02 M TNPP) gewaschen, 30 min bei 60°C getrocknet, in einem Szintillator nach BRAY (1960) aufgelöst, 30 min geschüttelt und die Radioaktivität gezählt. Jeder Punkt in den Kurven stellt den Mittelwert aus 3 Bestimmungen dar.

2.3.8 Herstellung Estradiolrezeptor-haltiger Extrakte

Samtliche Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Uteri von prapubertären Schweinen wurden nach Entnahme in eiskaltem Glycylglycin Puffer (0.05 M , pH 7.4) mit 0.005 M NaN_3 gesammelt, 2 x durch einen Fleischwolf gedreht und ein Gewichtsteil Fleischbrei mit zwei Volumen Glycylglycin Puffer (Endvol. 1.2 l) 10 min homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei $20000 \times g$, 30 min. Der Überstand wurde erneut bei $20000 \times g$, 105 min abzentrifu-

giert. Das Pellet wurde dann mit 2.2 ml 0.01 M Glycylglycin Puffer pH 8.2, 5 mM NaN_3 , 25 mM Dithioerythritol, 0.5 % Surfylnol 485 und 0.1 % SP-54 homogenisiert, über Nacht bei 0 °C im Schüttelbad extrahiert und anschließend bei 200000 x g, 105 min abzentrifugiert. Der Überstand enthält ca 5 mg/ml Protein und eine Estradiolrezeptorkonzentration von ca 4.0×10^{-9} M.

2.3.9 Messung des Einflusses von EA-3 auf die Bindung von ^3H -Estradiol am Estradiolrezeptor aus Schweineuterus

Das Reaktionsgemisch bestand aus 0.1 ml ^3H -Estradiol (2×10^{-7} M; 50 Ci/mmol), 0.1 ml Puffer (0.01 M Glycylglycin, pH 8.2 + 5 mM NaN_3) und 0.1 ml verschiedener Konzentrationen (2×10^{-7} – 2×10^{-5} M) der in DMSO:H₂O (1:1) aufgelosten Testsubstanz. Die Kontrollen enthielten unmarkiertes Estradiol (Sigma, Deisenhofen) in denselben Konzentrationen wie die Testsubstanzen. Nun wurde gestartet, indem man dem Reaktionsgemisch 0.8 ml Estradiolrezeptoranreicherung (ca 4×10^{-4} M) zusetzte. Anschließend wurden die Ansätze bei 0 °C 17 h unter Schütteln inkubiert, mit 0.1 ml Kohlesuspension (5 % Norit a + 0.5 % Dextran T 70) versetzt, 10 min geschüttelt, 5 min bei 20000 x g abzentrifugiert, der Überstand nochmal 5 min zentrifugiert und die Radioaktivität im Überstand bestimmt.

2.3.10 EA-3-Metaboliten in der Leberzelle

Ratten wurden durch überlange Ethernarkose getötet, die Lebern entnommen und 3 mal in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, mit 15 ml 0.32 M Succrose, 2 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) in einem motorgetriebenen Glas-Teflon Homogenisator zerkleinert (Antriebstyp 201, Fa. Heidolph, Heidenheim) (bei 2500 UpM zwei, bei 5000 UpM drei Stöße). Das Homogenat wurde 15 min bei 0 °C/1400 x g abzentrifugiert und der Überstand (10 ml) auf 37 °C erwärmt. 11 mg des

Biflavonoids EA-3 in 100 μ l DMSO gelöst wurde zugesetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert und dann das Inkubationsgemisch zweimal mit EtOAc extrahiert. Aliquote Anteile der eingedampften EtOAc-Phasen wurden in 0.1 M Acetatpuffer (pH 5) mit β -Glucuronidase und Arylsulfatase (Fa. Sigma, Deisenhofen) behandelt und 30 min bei 37 °C inkubiert.

Nach Lyophilisation wurden die Fraktionen dunnschichtchromatographisch analysiert und die Zonen nach absteigendem R_f -Wert als Banden X, Y und Z bezeichnet. Die Reindarstellung der EA-3-Metaboliten der EtOAc-Fraktion nach Enzymbehandlung erfolgte durch präparative Dunnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten in 0.5 mm Schichtdicke in $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}/\text{HCOOH}$ (9:2:1). Nach Elution mit Aceton und anschließender Filtration wurden 0.4 mg X, 2 mg Y und 0.8 mg Z erhalten und durch UV-, IR-, $^1\text{H-NMR}$ -, Massenspektroskopie sowie vergleichende DC-Analysen charakterisiert.

2.3.11 Kultur von Alexander-Hepatom-Zellen

Menschliche Hepatomzelle der Linie Alexander (ALEXANDER et al., 1976) wurden in Medium RPMI-1640 mit L-Glutamin (2 g/l), L-Leucin (50 mg/l), 100 I.E. Penicillin G/ml, 100 μ g Streptomycin/ml und 10 % foetalem Kalberserum in liegenden Falcon-Kulturflaschen bei 37 °C kultiviert. Die Gefäße waren luftdicht verschlossen und das Verhältnis Suspension-Luft betrug 1 : 4.

Bei einer Ausgangskonzentration von ca 1.0×10^5 Zellen/ml wuchsen die Alexander-Zellen innerhalb von 3 Tagen auf eine Zellkonzentration von ca 5.0×10^5 Zellen/ml. Wenn die Zellsuspension eine gelbe Farbe erreicht hat (nach etwa 4 bis 7 Tagen), wurden die Zellen nach BONIN (1973) trypsinisiert und umgesetzt.

Zum Umsetzen der Zellen wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgekippt, die Zellen 2 x mit der Trypsinisierungslosung (2 ml) unter leichtem Schwenken je 30 sec gewaschen und die überstehende Lösung jeweils

abgegossen. Dann wurden die Kulturflaschen bei 37 °C in den Trockenschrank gelegt, bis sich die Zellen von der Wand lösten (ca 6 min). Es wurde 10 ml Medium zugegeben, bei 37 °C 2 min/50 x g abzentrifugiert, der Überstand abgegossen, die Zellen erneut mit Medium suspendiert, gleichmäßig portioniert und bei 37 °C in feuchter Atmosphäre kultiviert.

Die Vitalität der Alexander-Zellen wurde durch Trypan-Blau-Färbung (0.4 %) geprüft. Die Wachstumsraten wurden durch Zählen von Aliquots in einer Neubauer-Zählkammer zu den jeweils angegebenen Zeiten erstellt.

Die sterilfiltrierte Trypsinisierungslosung hatte folgende Endkonzentrationen : 0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, 0.02 % KH_2PO_4 , 0.115 % Na_2HPO_4 , 0.02 % EDTA, 0.25 % Trypsin, pH 7.2 (Biochrom, Berlin). Die Salzkonzentrationen dieser Losung entsprachen der PBS-Lösung A (nach DULBECCO u. VOGT, 1954). Wichtig war, daß kein Ca^{2+} und Mg^{2+} enthalten war.

2.3.12 Messung der Aufnahme radioaktiver Vorstufen in Hepatozyten

Aus Ratten wurden Hepatozyten (5×10^6 Zellen/ml) isoliert und in Vollmedium gleichzeitig mit der in 20 μl DMSO:H₂O (1:1) aufgelösten Testsubstanz und bei 37°C unter 95 % O₂ + 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre vorinkubiert. Anschließend wurde gestartet, indem man dem Inkubationsgemisch die zu untersuchende radioaktive Verbindung (1.67 $\mu\text{Ci/ml}$) zusetzte. Die Kontrollen enthielten nur 20 μl des Lösungsmittels. Nach verschiedenen Zeiten (0-60 min) wurden jeweils 250 μl Probe entnommen, bei 0 °C 1 min/50 x g abzentrifugiert, nochmals mit 200 μl eiskaltem Medium RPMI-1640 30 sec gewaschen und sofort abzentrifugiert. Nach insgesamt 2 min wurde zu den Hepatozytenpellets 5 ml 10 %ige TCA zugesetzt und nach Zentrifugation (1500 x g, 2 min) die Radioaktivität im Überstand gemessen.

Analog wurden die Versuche mit Mause-Hepatozyten und

Alexander-Zellen durchgeführt.

2.3.13 Präparation von Liposomen

Die Liposomen wurden nach einer modifizierten Methode von MILSMANN et al. (1978) präpariert: Die Membrankomponenten und Na-Cholat als Emulgator wurden in einem Verhältnis von 0.6 eingewogen, so daß der Lecithingehalt, der als Hauptkomponente diente, 17 mM beträgt.

Alle Membrankomponenten (Lecithin bzw. Lecithin + 1 % Silibinin), sowie der Emulgator wurden in einen 100 ml Rundkolben übergeführt und in CHCl_3 (5 ml) gelöst. Das Lösungsmittel wurde bei Raumtemperatur abrotiert, dann wurde noch 2 x mit MeOH (je 5 ml) versetzt und wieder eingeeengt. Durch das schnelle Rotieren verteilen sich die Komponenten gleichmäßig an der Rundkolbeninnenwand. Nach ca 4 h Lyophilisieren wurden die Membranbestandteile in 900 μl Phosphatpuffer (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 150 mM NaCl, pH 7.4), der 1.25 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Inulin (Spez. Akt. 214.6 mCi/g) enthält, aufgenommen. Durch ständiges Schwenken des Rundkolbens lösen sich die Komponenten von der Glasoberfläche. Zuerst ist die Lösung sehr trübe, im Verlauf des Schüttelns wird sie jedoch opaleszierend. Es sind gemischte Micellen entstanden.

Die Lösung (900 μl) wurde in eine spezifische Dialyseapparat (Lipoprep, Fa. Dianorm) eingespritzt und zuerst 90 min gegen 50 ml Puffer, welcher ^3H -Inulin (1.25 $\mu\text{Ci/ml}$) enthält, dialysiert. Im Anschluß daran dialysiert man 10 h gegen 200 ml reinen Puffer. Die kontinuierliche Entfernung des Emulgators aus der wässrigen Lösung gemischter Micellen führt spontan zur Ausbildung von Liposomen. Anschließend wurden die Liposomen auf eine Säule (Sepharose 4B) gegeben und mit Phosphatpuffer eluiert, die Fraktionen bei 206 nm gemessen. Man erhält einen symmetrischen Elutionspeak. Die Fraktionen des Peaks, die den homogenen Liposomen entsprechen, wurden gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.14 Messung der durch Cholat-induzierten ^3H -Inulin-Freisetzung aus Liposomen ohne und nach Silibininbehandlung

a) Messung mit Silibinin-haltigen Liposomen

Zu 1.8 ml Cholatlösung verschiedener Konzentrationen (0-1250 μM) wurden 0.2 ml einer Silibinin-haltigen Liposomenpreparation mit einem Lipidgehalt von ca 2 μM zugegeben. Die Kontrolle enthielt kein Silibinin. Nach Zugabe des Cholats wurden die Gemische auf einem Schüttler (Vortex) maximal gemischt. Nach 10 min wurde das Gemisch bei 20 °C in Polycarbonatgefäßen zentrifugiert (200000 x g, 90 min) und die Radioaktivität im Überstand bestimmt.

b) Messung mit Liposomen, denen Silibinin im äußeren Medium zugesetzt wird

Zu 1.8 ml Cholatlösung verschiedener Konzentrationen (0 - 1250 μM) wurden 0.2 ml einer Liposomenpreparation zugegeben, die mit Silibinin 1-5 h bei 4 °C vorinkubiert worden war. Das Gemisch wurde wie oben beschrieben weiter behandelt. Die Kontrollen enthielten kein Silibinin.

2.3.15 Messung der ATPase-Aktivität ohne und unter dem Einfluß von EA-3 und Silibinin

Das Reaktionsgemisch (Endvolumen 0.1 ml) bestand aus 25 mM Pipes-Tris Puffer (pH 6.5), 0.25 M Sorbitol, 3 mM MgSO_4 und 0.125 % Nonanoyl-N-methylgluconamid. 0.6 mU (2 U/mg) ATPase ohne oder mit 0.1 bzw. 1 mM der zu testenden Substanz wurde dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Nach fünfminütiger Präinkubation bei 30 °C wurde durch Zugabe von 3 mM ATP-Na (pH 7) zum Inkubationsgemisch gestartet und die Reaktion nach 15 min mit 0.5 ml eiskalter 0.5 M TCA gestoppt; das Reaktionsgemisch bei 0 °C, 1 min/50 x g abzentrifugiert und das freigesetzte Phosphat im Überstand nach LANZETTA et al. (1979) bestimmt. Dazu wurden zu 50 μl des Überstandes 800 μl

Color-Reagenz (9 ml 0.045 % Malachitgrün-HCl + 3 ml 4.2 % Ammoniummolybdat in 4 N HCl + 240 μ l Sterox) zugesetzt. Nach 1 min erfolgte die Zugabe von 100 μ l 34 % Citrat-Lösung. Die Extinktion wurde bei 660 nm ($d = 1$ cm) und bei Raumtemperatur nach 30 min gemessen und die erhaltenen Werte mit einem Standard von KH_2PO_4 verglichen.

2.3.16 Autoradiographie von Leberschnitten aus ^3H -Silibinin-behandelten Ratten

Männlichen Wistarratten (120 g) wurden je 7.5 μCi ^3H -Silibinin (Spez. Akt. 322 mCi/mmol), in 0.5 ml DMSO/ H_2O (1:1) gelöst, i.p. injiziert. Nach 24 h wurden die Lebern entnommen und in physiol. NaCl-Lösung gewaschen, 8 μm dicke Gefrierschnitte der Lebern 5 min mit 4 % Formol in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7, fixiert und den Schnitten dann ein Kodak-AR-10-Strippingfilm aufgelegt. Nach 8 Wochen Expositionszeit bei 4 °C wurden die Präparate entwickelt. Daraufhin erfolgte eine Färbung mit Hamalaun (Merck, Darmstadt) und nach vollständiger Trocknung die Eindeckung mit Ceadex (Merck, Darmstadt).

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In der traditionellen nigerianischen Medizin werden Extrakte aus den Nüssen von *Garcinia kola* (HECKEL) seit Jahrhunderten zur Behandlung von Lebererkrankungen eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus den Nüssen zwei in Lebertesten wirksame Substanzen isoliert und chemisch charakterisiert. Ihr Einfluß auf die Biosynthese von Makromolekulan in Leberparenchymzellen wurde untersucht und der Wirkmechanismus wahrscheinlich gemacht. Darüberhinaus wurden Effekte auf die Membranpermeabilität beobachtet.

Durch selektive Extraktion der Nüsse von *G. kola* mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen konnten in Kombination mit Schlafdauer-Testen in vivo an Ratten, sowie durch einen in-vitro-Test (GPT-Freisetzung aus Ratten-Hepatozyten nach CCl_4 - und GalN -Schädigung) die Wirkstoffe der Droge identifiziert werden. Durch Kombination von chromatographischen Verfahren wurden 14 Substanzen isoliert. Die zwei mengenmäßig hauptsächlich anfallenden Verbindungen, genannt EA-2 und EA-3 konnten nach chemischen Analysen, sowie durch UV-, IR-, NMR-, CD- und Massen-Spektroskopie als (2*S*,2' *R*, 3*R*,3' *R*)-2'-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2, 2',3,3'-tetrahydro-3',-5,5',7,7'-pentahydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3,8'-bi-4*H*-1-benzopyran-4,4'-dion und (2*S*,2' *R*, 3*R*,3' *R*)-2,2',3,3'-Tetrahydro-3',5,5',7,7'-pentahydroxy-2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)-3,8'-bi-1-4*H*-benzopyran-4,4'-dion identifiziert werden. Beide Verbindungen liegen als Atropisomerenpaare vor. Die absolute Konfiguration im Flavanonteil ist 2*S*3*R* und im Flavanonolteil 2*R*3*R*. Nach der Strukturaufklärung zeigte sich, daß die Substanzen bereits von COTTERILL und SCHEINMANN 1978 - allerdings ohne Aussagen zur Stereochemie - beschrieben worden waren.

In in vitro Testen wurde der Einfluß von EA-3 bzw. EA-2 auf die Protein- und RNA-Synthese in Ratten-Hepatozyten

untersucht. In Anwesenheit geringer Konzentrationen (EA-3 4-9 μM , EA-2 9-17 μM) wird die Protein-Syntheserate in den Leberzellen um 26 % bzw. 18 % ähnlich wie durch das Flavonolignan Silibinin (SONNENBICHLER & ZETL, 1986) stimuliert. In ähnlichem Ausmaß wird auch die RNA-Synthese gesteigert.

Eine wesentliche Feststellung im Vergleich zu den Experimenten mit Silibinin ist der Befund, daß die Garcinia-Biflavonoide in Transkriptionsexperimenten mit isolierten Zellkernen in vitro ihre synthesesstimulierenden Eigenschaften auf die RNA-Synthese nicht mehr zeigen. Dieser Befund deutete an, daß es Metaboliten der "Wirkstoffe" sind, welche die Makromolekül-Synthese in Leberzellen stimulieren können. Für diese These sprach ein weiterer Befund, nämlich daß EA-3 die Bindung von ^3H -Estradiol an den Estradiolrezeptor nicht kompetitiv inhibiert, wie das von Silibinin mittlerweile bekannt ist (SONNENBICHLER und JUNGBLUT, 1986).

Es konnte gezeigt werden, daß die Garcinia-Flavonoide durch Leberhomogenate u.a. in Taxifolin gespalten werden. Die stimulierende Wirkung von Taxifolin auf die RNA-Synthese ist aber von SONNENBICHLER und POHL (1980) schon beschrieben worden. Das Molekül enthält noch die für die Wirkung von Silibinin wichtigen Strukturmerkmale. Der Wirkungsmechanismus der Garcinia-Biflavonoide war damit weitgehend verständlich. Die Garcinia-Flavonoide entfalten also nach Metabolisierung analog dem Silibinin ihre antihepatotoxische Wirkung in der Leberzelle via Interaktion mit der RNA-Polymerase I.

Bei Einsatz höherer Konzentrationen, d.h. $> 90 \mu\text{M}$ EA-3 bzw. $> 210 \mu\text{M}$ EA-2 kann eine deutliche Verminderung des Precursoreinbaus in neusynthetisierte Proteine bzw. RNA beobachtet werden. Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit auch für Silibinin in Konzentration $> 23 \mu\text{M}$ nachgewiesen werden. Der Verdacht, daß die untersuchten Flavonoide in höherer Konzentration die Membranpermeabilität beeinflussen, konnte bestätigt werden: Die Garcinia-Flavonoide, sowie Silibinin reduzieren in Konzentrationen $> 10 \mu\text{M}$ die Aufnahme von

Uridin, Methionin, Thymidin, Calcium-Ionen, Galactosamin und α -Aminoisobutytrat, die als Beispiele für niedermolekulare Verbindungen gewählt wurden, in Hepatozytenzellen. Dies bedeutet, die beobachtbare Verminderung des Precursoreinbaus in neusynthetisierte RNA bzw. Proteine ist nicht die Folge einer geringeren Synthesegeschwindigkeit in Gegenwart höherer Flavonoidkonzentration, sondern die Folge einer gehinderten Aufnahme des radioaktiven Labels, wodurch die Syntheserate kleiner erscheint. Um erste Einblicke in die Art der Flavonoid-Membran-Interaktion zu bekommen, wurde die Affinität der Flavonoide zu Lipiden und zu Membranproteinen untersucht. Es zeigte sich, daß in künstlichen Liposomen keine meßbare Wechselwirkung mit den Lipidkomponenten auftritt. Hingegen wurde in einem Modellexperiment mit der Membran-ATPase eine Hemmung der Aktivität des Enzyms durch die Flavonoide festgestellt. Dies dürfte eine **unspezifische** Hemmung sein, die häufig zwischen Polyphenolen und Proteinen auftreten und die durch die Arbeiten von HASLAM und LILLEY (1986) bekannt wurden.

Daß Silibinin bzw. EA-3 auch in vivo stark an die Zellmembran bindet, wurde durch Autoradiographie gezeigt. Die Interaktion der untersuchten Flavonoide mit dem Membrantransport und die damit verbundene Einschränkung der Permeabilität geben eine Erklärung für den für Silibinin gültigen klinischen Befund, wonach das Flavonolignan die Zellmembran der Leberparenchymzellen gegen den Eintritt von Toxinen stabilisieren kann. Die bei hoher Dosierung meßbare antagonistische Wirkung von Silibinin gegen die Amatoxine des Knollenblätterpilzes wird so verständlich.

V. LITERATUR

- Alexander, J.J., Bey, E.M., Geddes, E.W. und Lecatsas, G.
(1976) S. Afr. med. J. 50, 2124 - 2128
- Antweiler, H. (1977) in "Current Problems in Clinical
Biochemistry", Vol. 7. Bertelli, A., Fournier, E.,
Frimmer, M. und S. Gorini Eds. pp.111 - 120, Piccin
Editore, Padova
- Aplin, R.T., Blasdale, J.H.C., Halsall, T.G. und Honby,
G.M. (1967) J. Chem. Soc. (C), 246 - 248
- Bauer, H., Kasperek, S. und Pfaff, E. (1975) Physiol. Chem.
356, 827 - 838
- Berg, T., Boman, D. und Seglen, P.O. (1973) Exp. Cell Res.
72, 571 - 574
- Berry, M.N. und Kum, E. (1972) Eur. J. Biochem. 27,
395 - 400
- Bonin, O. (1973) in "Quantitative virologische Methodik",
S. 94, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Bray, G.A. (1960) Analyt. Biochem. 1, 279 - 285
- Bresnick, E. (1971) Meth. Canc. Res. VI, 347 - 391, Acad.
Press, N.J. London
- Bryant, J.C., Evans, V.J., Schilling, E.L. und Earle, W.R.
(1961) J. Nat. Can. Inst. 26, 239 - 242
- Cahn, R.C., Ingold, C.K. und Prelog, V. (1956) Experientia
12, 81 - 94

- Clark, M.J.Jr. und Albert, Y.C. (1965) J.Biol. Chem. 240(12), 4743 - 4745
- Clark, J.M.Jr. und Chang, Y.A. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4734 - 4739
- Cotterill, P.J. und Scheinmann, F. (1978) J.C.S. Perkin I, 532 - 539
- Darnell, J.E., Phillipson, L., Wall, R. und Adesnik, M. (1971) Science 174, 507 - 510
- Deat, A.G., Louis, L.N. und Hoffenberg, R. (1973) Exp. Cell Res. 76, 41 - 46
- Deters, D.W., Racker, E., Nelson, N. und Nelson, H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1041 - 1047
- Diedrich, D.F. und Stringham, C.H. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 138, 499 - 505
- Diesel, P. (1974) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Donner, D.B., Nakayama, K., Lutz, U. und Isonenberg, M. (1978) Biochem. Biophys. Acta 507, 322 - 336
- Dulbecco, R. und Vogt, M. (1954) Journ. exp. Med. 99, 167
- Ennis, H. und Lubin, M. (1964) Sci. 146, 1474 - 1476

- Faulstich, H., Jahn, W. und Wieland, Th. (1980) *Arzneim.-Forsch.* 30(1), 3, 452 - 454
- Fiebig, M. (1983) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Fodor, E.I.B. und Doty, P. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 77, 1478 - 1485
- Frimmer, V.M. und Kroker, R. (1975) *Arzneim.-Forsch.* 25(3), 394 - 396
- Fritz-Niggli, H. (1968) *Praxis* 57, 180 - 183
- Gaffield, W. (1970) *Tetrahedron* 26, 4093 - 4108
- Garrahan, P.J. und Garay, R.P. (1976) *Curr. Top. Membr. Transport* 8, 9 - 12
- Geiger, H. und Quinn, C. (1975) in "The Flavonoids", Eds. Harborne, B.J., Mabry, J.T. and Mabry, H., pp. 715, Chapman and Hall Ltd., London
- Greene, E.C. (1935) *Trans. Amer. Phil. Soc.* 27, 35 - 41
- Grummt, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79, 133 - 141
- Guguen-Guillonzo, C., Tichonicky, L., Szajnert, M., Scjpira, F. und Kruk, J. (1978) *Biol. Cell Res.* 31, 225 - 234
- Hahn, G., Lehmann, H.D., Kurten, M., Uebel, H. und Vogel, G. (1968) *Arzneim.-Forsch.* 18, 698 - 704

- Hammerl, H., Pichler, O. und Studlar, M. (1971) Med. Klin. 66, 1204 - 1209
- Hanks, J.H. und Wallace, E.R. (1949) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196 - 200
- Harrison, R. und Lunt, G.G. (1980) in "Biological Membranes, Their Structure and Function", Eds. Harrison, R. und Lunt, G.G. pp. 167 - 195, Blackie and Sons Ltd., Glasgow G64 2NZ
- Hartmann, G., Coy, U. und Kniese, G. (1962) Z. Physiol. Chem. 330, 227 - 253
- Haslam, E. und Lilley, H.T. (1986) in "Plant Flavonoids in Biology and Medicine", Eds. Cody, V., Middleton, E.Jr., Harbone, B.J., Alan R. Liss, INC., New York, p. 53 - 65
- Hauschka, P. (1973) Meth. Cell Biol. 7, 418 - 454
- Hayoe, F.G.J. und Quaglino, D. (1965) Nature 205, 151 - 154
- Hikino, H. (1984) in "Proceedings of the Alfred Benzon Symposium 20", Eds. Krogsgaard-Larsen, P., Christensen, B.S., Kofod, H., pp. 374 - 389, Munksgaard, Copenhagen
- Hikino, H., Kiso, Y., Wagner, H. und Fiebig, M. (1984) Planta Medica 50(3), 248 - 250
- Holler, M. und Brauer, H. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1208 - 1209

- Howard, R.B. und Pesch, L.A. (1968) J. Biol. Chem. 243(11),
3105 - 3109
- Hutchinson, J. und Daziel, M.J. (1954) Flora of West
Tropical Africa, 2 nd Eds., (Revised by Keay, R.W.J.),
Vol. 1, pp. 295, H.M.S.O., London
- Ilan, J. und Singer, M. (1975) J. Mol. Biol. 91,
39 - 51
- Iwu, M. und Igboko, O. (1982) J. Nat. Prod.(Lloydia),
45, 650 - 651
- Joshi, B.S., Kamat, N.V. und Viswanathan, N. (1970)
Phytochemistry 9, 881
- Karmen, A., Wroblewski, F. und Ladue, J. (1955) J. Clin.
Invest. 34, 126
- Kiso, Y., Tohkin, M. und Hikino, H. (1983a) Planta Med.
49, 222 - 225
- Kiso, Y., Tohkin, M. und Hikino, H. (1983b) J. Nat. Prod.
46, 841 - 847
- Lang, D.R. und Racker, E. (1974) Biochem. Biophys. Acta.
333, 180 - 186
- Lanzetta, A.P., Alvarez, J.L., Reinach, S.P. und Candia,
A.O. (1979) Anal. Biochem. 100, 95 - 97
- Le Cam, A. und Freychet, P. (1977) J. Biol. Chem. 252(1),
148 - 156
- Lefevre, P.G. (1959) Sci. 130, 104 - 105

- Machicao, F. und Sonnenbichler, J. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 141 - 147
- Madubunyi, I. (1981) Symposium, Universität Nigeria
Nsukka
- Madubunyi, I. (1983) Diplomarbeit, Universität Nigeria
Nsukka
- Magliulo, E., Carosi, P.G., Minoli, L. und Gorini, S. (1973) Arzneim.-Forsch. 23, 161 - 167
- Magliulo, E., Scevola, D. und Carosi, P.G. (1979) Arzneim.-Forsch. 29(II), 7, 1024 - 1078
- Markham, K.R. (1982) Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press London
- Milsmann, M.H.W., Schwendener, R.A. und Weder, H.G. (1978) Biochem. Biophys. Acta 512, 147 - 155
- Morgan, J.F., Morton, H.J. und Parket, R.C. (1950) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1 - 8
- Muramatsu, M., Hodnett, J.L. und Busch, H. (1964) Biochem. Biophys. Acta 91, 592 - 597
- Niebes, P. und Ponard, G. (1975) Biochem. Pharmacol. 24, 905 - 909
- Olaniyi, A.A. und Phillip, A.A. (1979) The Nigerian J. Pharm. 10(5 & 6), 208 - 210
- Paradisi, F., Cifarelli, A. und Pepe, G. (1977) Epatologia 23, 237 - 243

- Perasassi, T., Martellucci, A., Conti, F. und Messina, B.
(1984) Cell Biochem. Funct. 2, 85 - 88
- Pew, C.J. (1948) J. Amer. Chem. Soc. 70, 3031 - 3034
- Plagemann, P.G.W. (1970) J. Cell Physiol. 77,
213 - 240
- Popper, H. (1976) in "Membran Alterations as Basis
of Liver Injury", Eds. Popper, H., Bianchi, L.,
Reutter, W., pp. xv - xxii, MPT Press Ltd.
- Poser, G. (1971) Arzneim.-Forsch. 21, 1209 - 1211
- Ramellini, G. und Meldolesi, J. (1974) Arzneim.-Forsch.
24, 806 - 808
- Ramellini, G. und Meldolesi, J. (1976) Arzneim.-Forsch.
26, 69 - 73
- Reich, E. und Goldberg, J.H. (1964) Progr. Nucleic Acid
Res. Mol. Biol. 3, 184 - 234
- Ring, K., Ehle, H. und Schwarz, M. (1976) Naunyn-Schmied-
berg's Arch. Pharmacol. 294, 217 - 224
- Ring, K., Ehle, H., Foit, B. und Schwarz, M. (1977) in
"Flavonoids and Bioflavonoids", Eds. Farkas, L.,
Garbor, M., Kally, F., pp. 427 - 478, Elsevier,
Amsterdam, Oxford, New York
- Ring, K., Langheinrich, W., Ehle, H. und Rohde, E. (1973)
Pharm. Res. Comm. 5, 367 - 373
- Robinson, J.W.L., L'Herminier, M. und Claudet, H.G.H. (1979)
Naunyn-Schmieddeberg's Arch. Pharmacol. 307, 78 - 89

- Scholtissek, C. (1968) Biochem. Biophys. Acta 158,
435 - 447
- Schopen, R.D., Lange, O.K., Panne, C. und Kirnberger, E.J.
(1969) Med. Welt 20, 888
- Schreiber, G. und Schreiber, M. (1973) Sub-Cell Biochem.
2, 307 - 353
- Schriewer, H. und Rutkowski, G. (1979) Bericht
- Seeger, R. (1971) Arzneim.-Forsch. 21(10), 1599 -
1605
- Seglen, P.O. (1973) Expt. Cell Res. 76, 25 - 30
- Seglen, P.O. (1976) Meth. Cell Biol. 13, 29 - 83
- Seshadri, R.T. (1962) in "The Chemistry of Flavonoid
Compounds", Eds. Geissman, T.A., Pergamon, Oxford, pp.
9
- Shinoda, J. (1928) J. Pharm. Soc. Japan 48, 35
- Sisler, H. und Siegel, M. (1967) in "Antibiotics", Eds.
Gottlieb, D und Shaw, P., pp. 283, Springer-Verlag, New
York
- Skipiski, V.P., Barclay, M., Archibald, F.M., Terebus-
Kekish, O., Reichman, E.S. und Good, J.J. (1965) Life
Sci. 4, 1673 - 1680
- Sonnenbichler, J., Goldberg, M., Hane, L., Madubunyi,
I., Vogl, S. und Zetl, I. (1986) Biochem. Pharmacol.
35(3), 538 - 541

- Sonnenbichler, J. und Jungblut, P.W (1986) Unpublished Results
- Sonnenbichler, J., Mattersberger, J. und Hanser, G. (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1751 - 1756
- Sonnenbichler, J., Mattersberger, J. und Rosen, H. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1171 - 1180
- Sonnenbichler, J. und Pohl, A. (1980) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1757 - 1761
- Sonnenbichler, J. und Zetl, I. (1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 555 - 566
- Sonnenbichler, J. und Zetl, I. (1985) in "Flavonoids and Bioflavonoids", Eds. L. Farkas, M. Gabor, F. Kally p. 361 - 372
- Sonnenbichler, J. und Zetl, I. (1986) in "Plant Flavonoids in Biology and Medicine", Eds. Cody. V., Elliott Middleton, Jr., Harborne, B.J., pp. 319 - 331, Alan R. Liss, Inc. New York
- Stirpe, F. und Fiume, L. (1967) Biochem. J. 105, 779 - 782
- Suolinna, E.M., Buchsbaum, R.N. und Racker, E. (1975) Cancer Res. 35, 1865 - 1872
- Taube, R.A. (1972) Biochem Biophys. Acta 255, 6 - 18
- Tesi, T. und Forssmann, W.G. (1971) Pflügers Arch. Physiol. 322, 188 - 191

- Ungemach, R.F. und Hegner, D. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 845 - 856
- Valenzuela, A., Barria, T., Guerra, R. und Garrido, A. (1985) Biochem. Biophys. res. Comm. 126, 712 - 718
- Vidrich, A., Airhart, J., Bruno, M.K. und Khairallah, E. (1977) Biochem. J. 162, 257 - 266
- Vogel, G. (1968) Arzneimittel.-Forsch. 18, 1063 - 1064
- Vogel, G. und Temme, I. (1969) Arzneimittel.-Forsch. 19, 613 - 615
- Wagle, S.R. und Ingebretsen, Jr.W.R. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 125 - 129
- Wagner, H. (1981) in "Natural Products as Medicinal Agents", Eds. Beal, J.L. and Reinhard, E., pp. 217 - 241
- Waymouth, Ch. (1953) J. Nat. Canc. Inst. 22, 1003 - 1015
- Weber, M.J. und Rubin, H. (1970) J. Cell Physiol. 77, 157 - 168
- Weil, G. und Frimmer, M. (1970) Arzneimittel.-Forsch. 20, 862 - 863
- Wiegand, K., Muller, M., Urban, J. und Schreiber, G. (1971) Expt. Cell Res. 67, 27 - 32
- Wisseemann, R. (1978) in "Aktuelle Hepatologie, III. Int. Lebersym. Experimentelle und Klinische Hepatologie", Koln, pp. 55, Hansisches Verlagskontor, Lubeck

Abkürzungen

$^3\text{H}-\alpha\text{-AIB}$	= $^3\text{H}-\alpha\text{-Aminoisobutyrat}$
ATP-Na	= Adenosintriphosphat-Natrium
BSA	= Rindereserumalbumin
CD	= Circular dichroismus
cpm	= Counts per minute
CCl_4	= Tetrachlorkohlenstoff
DMSO	= Dimethylsulfoxid
$\text{d}_6\text{-DMSO}$	= Hexadeuterodimethylsulfoxid
DTE	= Dithioerythrit
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	= Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
GalN	= Galactosamin
GPT	= Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hepes	= N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
I.E.	= Internationale Einheiten
i.p.	= intraperitoneal
LDH	= Lactatdehydrogenase
ME	= Massen-Einheiten
Mr	= relative Molekülmasse
NADH	= reduziertes Nicotinamidadenin-dinukleotid

PBS	=	phosphatgepufferte Salzlsg. n. DULBECCO u. VOGT, 1954
Persantin	=	2,6-bis(diethanolamino)-4,8- dipiperidino-pyrimido(5,4- <i>d</i>) pyrimidin
Pipes	=	Piperazin-N,N'-bis(2-ethan- sulfonat); 1,4-Piperazindiethan- sulfonat
PMSF	=	Phenylmethansulfonylfluorid
p.o.	=	per os
SP-54	=	Polypentosansulfat
Surfynol	=	3,5-Dimethyl-1-hexin-3-ol
TCA	=	Trichloressigsäure
TNPP	=	Tetranatriumpyrophosphat
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	=	Internationale Unit
³ H-UTP	=	³ H-Uridintriphosphat

Lebenslauf

Ifeanyi M A D U B U N Y I

geb. am 21.10.1951 in Ihiala/Nigeria

- Eltern : Michael MADUBUNYI, Städt. Angestellter
und Maria MADUBUNYI, geb. NWANKWO
- Schulbildung : 1958 - 1963 Volksschule Nkwerre/Imo-
Stadt Nigeria
1965 - 1971 Gymnasium St. Patrick's
College, Asaba Nigeria
1972 - 1973 Post-Gymnasium Govt.
College, Ughelli Nigeria
1974 - 1977 Studium der Biochemie,
Universität Ibadan Nigeria
1981 - 1983 Studium der pharmako-
logischen Biochemie, Universität
Nigeria Nsukka
3.10.1983 - 28.3.1984 Deutsch-
kurs am Goethe-Institut, Freiburg
ab April 1984 Anfertigung der vor-
liegenden Doktorarbeit am Max-Planck-
Institut für Biochemie, Martinsried b.
München

